

2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal)

"ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA
PARATUBERCULOSIS OVINA EN LA
PROVINCIA DE SEGOVIA"

F. JAVIER TEJEDOR MARTIN

Licenciado en Veterinaria

Septiembre, 1993.

"Estudio epidemiológico de la Paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia"

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Veterinaria por el licenciado:

Francisco Javier Tejedor Martín

Directora de la Tesis:

Dra. Isabel Simarro Fernández

Profesor Titular

Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal)

Opto. Patología Animal I
(Sanidad Animal)
Facultad de Veterinaria
U.C.M.
Ayda. Puerta de Hierro, s/n
28040 - Madrid

D^a ISABEL SIMARRO FERNANDEZ, Profesora titular del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

C E R T I F I C O :

Que la tesis doctoral titulada "Estudio epidemiológico de la Paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia", de la que es autor el licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, **D. Fco JAVIER TEJEDOR MARTIN**, ha sido realizada en los laboratorios del departamento de Patología animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Por ello de acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación, como director de la mencionada Tesis Doctoral en Madrid a siete de Septiembre de mil novecientos noventa y tres.



[Handwritten signature]
Prof. D^a. Isabel Simarro Fernández

A Ana
A Mise
A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar públicamente mi más profunda gratitud a la Prof. Dra. Isabel Simarro Fernández, por su paciencia durante todos estos años y su apoyo en los momentos difíciles, lo que ha tenido tanta valía para mí como su dirección técnica en este trabajo.

Al Dr. D. Olimpio Fuentes Pérez, bajo cuyo auspicio me inicié en los laboratorios del INIA en las técnicas de diagnóstico de esta enfermedad.

Al Prof. Dr. D. Miguel Tesouro, quien no ha escatimado apoyos tanto materiales como morales.

Al Prof. Dr. D. Ricardo de la Fuente por su asesoramiento en cuestiones de bacteriología y de patología ovina en lo que es un auténtico experto.

A todo el personal del departamento de Patología Animal I por su compañerismo y ayuda.

Al personal del departamento de Patología Animal II (Anatomía Patológica), donde se realizaron los análisis histológicos.

Al personal del Servicio de Investigación y Mejora Agraria (SIMA) de Derio, especialmente a la Dra. Carmen Sáez de Ocáriz y al Dr. D. Ramón Juste, por su ayuda en la realización del estudio serológico.

A los veterinarios D. Antonio Fraile, D. Jesús de Santos, y D. Daniel Olmos, directores de los mataderos de Cuéllar, Carbonero y Fuentepelayo respectivamente.

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1.-	IMPORTANCIA Y SITUACION ACTUAL DEL PROBLEMA.....	2
I.2.-	PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE.	6
I.3.-	ANTECEDENTES HISTORICOS.	6
I.4.-	ETIOLOGIA.	8
I.4.1.-	LAS MICOBACTERIAS.	8
I.4.2.-	MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS.	10
I.4.2.1.-	Cultivo.	11
I.4.2.2.-	Identificación.	11
I.4.2.3.-	Variedades.	14
I.4.2.4.-	Resistencia.	15
I.5.-	EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD.	16
I.6.-	PATOGENIA.	19
I.7.-	SINTOMATOLOGIA.	22
I.8.-	LESIONES.	24
I.8.1.-	Lesiones macroscópicas.	25
I.8.2.-	Lesiones microscópicas.	28
I.9.-	DIAGNOSTICO.	29
I.9.1.-	DIAGNOSTICO CLINICO-EPIDEMIOLOGICO.	29
I.9.2.-	DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO.	30
I.9.3.-	DIAGNOSTICO ETIOLOGICO.	30
I.9.3.1.-	Bacterioscopia directa.	31
I.9.3.2.-	Histopatología.	31
I.9.3.3.-	Aislamiento.	32
I.9.3.4.-	Reacción en cadena de la polimerasa.	35
I.9.4.-	DETECCION DE LA INMUNIDAD DE BASE CELULAR. ...	35
I.9.4.1.-	Reacción intradémica.	35
I.9.4.2.-	Pruebas "in vitro".	36

I.9.5.-	DETECCION DE LA INMUNIDAD HUMORAL.	37
I.9.5.1.-	Agar Gel Inmuno Difusión (AGID).	37
I.9.5.2.-	Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA).	38
I.9.5.3.-	Otras.	39
I.10.-	TRATAMIENTO.	39
I.11.-	CONTROL.	40
I.12.-	VACUNACION.	44
II.	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.	47
III.	MATERIALES Y METODOS.	50
III.1.-	REACTIVOS Y SOLUCIONES.	50
III.1.1.-	REACTIVOS.	50
III.1.2.-	SOLUCIONES EMPLEADAS.	52
III.2.-	CEPAS EMPLEADAS.	57
III.3.-	MEDIOS DE CULTIVO.	57
III.3.1.-	Medio Lowenstein Jensen modificado (Fuentes,1988).....	57
III.3.2.-	Medio Lowenstein Jensen modificado (Juste,1989).....	58
III.3.3.-	Medio Lowenstein Jensen sin micobactina. ..	58
III.3.4.-	Medio líquido para cultivo de <u>M. phlei</u>	59
III.3.5.-	Obtención de micobactina.	59
III.3.6.-	Medio líquido Middlebrook 7H9.	60
III.4.-	MUESTRAS DE CAMPO. DISEÑO.	61
III.4.1.-	Rebaños estudiados durante 1988.	61
III.4.2.-	Muestras obtenidas a partir de dos rebaños seleccionados en los que se aplicó un programa de vacunación durante los años 1989 y 1990.	64
III.4.3.-	Muestreo aleatorio en un rebaño sin sintomatología de la enfermedad.	65
III.4.4.-	Muestras obtenidas en matadero durante los años 1990 y 1991.	66
III.4.5.-	Obtención de sueros.	67

III.5.-	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	67
III.5.1.-	Muestras de tejidos para tinción.	67
III.5.1.1.-	Método de Ziehl-Neelsen.	67
III.5.1.2.-	Histopatología.....	68
III.5.2.-	Tratamiento de las muestras de tejidos para cultivo micribiológico.	69
III.5.3.-	Tratamiento de las muestras de heces para cultivomicrobiológico.	69
III.6.-	METODOS DE DECONTAMINACION DE LAS MUESTRAS.	70
III.6.1.-	Decontaminación con lauril sulfato sódico. .	70
III.6.2.-	Decontaminación con cloruro de benzalconio. .	70
III.7.-	CONDICIONES Y METODOS DE CULTIVO.	71
III.7.1.-	Prueba previa utilizando dos tipos de soportes.....	71
III.7.2.-	Técnica de cultivo.	71
III.8.-	PRUEBAS BIOQUIMICAS.	72
III.8.1.-	Prueba de la niacina.	72
III.8.2.-	Prueba de la catalasa a 68°C.	73
III.8.3.-	Prueba de la hidrólisis del Tween-80.	73
III.9.-	PRUEBAS SEROLOGICAS.	74
III.9.1.-	Agar gel inmuno difusión (AGID).	74
III.9.2.-	Enzimoinmunoensayo (ELISA).	74
III.9.2.1.-	Adsorción del antígeno.	74
III.9.2.2.-	Tratamiento de los sueros.	75
III.9.2.3.-	Método.	75
III.9.2.4.-	Interpretación de los resultados.	75
III.10.-	METODOS ESTADISTICOS.	76
III.10.1.-	Evaluación de las técnicas de diagnóstico, sensibilidad y especificidad.	76
III.10.2.-	Grado de acuerdo entre las técnicas empleadas.....	78

IV. RESULTADOS.	81
IV.1.- RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS REBAÑOS ESTUDIADOS DURANTE 1988.	81
IV.1.1.- RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE TEJIDOS SOMETIDAS A TINCION. PUESTA EN EVIDENCIA DEL AGENTE MEDIANTE METODOS DIRECTOS.	81
IV.1.2.- HISTOPATOLOGIA.	81
IV.1.3.- RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL CULTIVO MICROBIOLOGICO.	82
IV.1.3.1.- Resultados de los distintos tratamientos de las muestras.	83
IV.1.3.2.- Resultados de las pruebas bioquímicas.	85
IV.1.4.- RESULTADOS DE LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD EN LOS REBAÑOS ESTUDIADOS DURANTE 1988.	86
IV.2.- RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE 1989 Y 1990.	88
IV.2.1.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL REBAÑO SIN INCIDENCIA CLINICA PERTENECIENTE A LOS ANALIZADOS ANTERIORMENTE.	88
IV.2.1.- RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE DOS REBAÑOS SOMETIDOS A UN PROGRAMA SANITARIO Y DE VACUNACION DURANTE 1989 Y 1990.	90
IV.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MATADERO DURANTE LOS AÑOS 1990 Y 1991.	92
IV.3.1.- EFICIENCIA DIAGNOSTICA DE LA BACTERIOSCOPIA DIRECTA SOBRE ANIMALES SANOS.	92
IV.3.2.- EFICIENCIA DIAGNOSTICA DE LOS CULTIVOS MICROBIOLOGICOS SOBRE ANIMALES SANOS.	94
IV.3.3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MATADERO EMPLEANDO AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <u>M.paratuberculosis</u> .	96
IV.3.4.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MATADERO MEDIANTE EL EMPLEO DE TECNICAS SEROLOGICAS.	97
IV.3.4.1.- Resultados de la prueba de Agar Gel Inmuno Difusión (AGID).	98
IV.3.4.2.- Resultados del enzimoinmunoensayo.	98

IV.3.5.-	COMPARACION DE RESULTADOS DIAGNOSTICOS SEGUN LA TECNICA EMPLEADA.	99
V. DISCUSION.	103
V.1.-	SOBRE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO.	103
V.2.-	LA INCIDENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS EN LA ZONA ESTUDIADA.	111
V.3.-	PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD: SUS RELACIONES CON LOS SISTEMAS DE MANEJO.	113
V.4.-	EFICACIA DE LA VACUNACION.	115
VI. CONCLUSIONES.	119
VII. BIBLIOGRAFIA.	122
VIII. ICONOGRAFIA.	145

I. INTRODUCCION

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA PARATUBERCULOSIS EN LA PROVINCIA DE SEGOVIA

I. INTRODUCCION

I.1. IMPORTANCIA Y SITUACION ACTUAL DEL PROBLEMA.

Debido a los avances sanitarios en la producción ovina acompañados de otros progresos en los campos de la alimentación y la reproducción, se ha conseguido en los últimos años un aumento sustancial de la rentabilidad en esta especie. Paralelamente, se ha producido una disminución en la incidencia clínica de las enfermedades agudas de origen infeccioso y/o parasitario, así los procesos patológicos de curso crónico se están convirtiendo en la principal causa de pérdidas económicas.

En las explotaciones de tipo intensivo y semiintensivo las afecciones de tipo crónico han pasado a ocupar el primer lugar en cuanto a origen de bajas, ocasionando, además una notable disminución de la producción. En la actualidad, el control de enfermedades como la Paratuberculosis (objeto que nos ocupa), el Visna-Maedi, la Adenomatosis pulmonar, la Pseudotuberculosis, algunas intoxicaciones y distintas enfermedades parasitarias como la Dicroceliosis, la Hidatidosis o la Fasciolosis, supone uno de los puntos clave para aumentar la rentabilidad del grupo.

En general, la aparición tardía, desde el punto de vista clínico, y el curso lento e insidioso de estos procesos hacen que se genere una gran disminución de la capacidad productiva del animal a medio plazo. Esta problemática suele ocasionar un número considerable de bajas, tanto en ganado ovino de cualquier tipo de producción como en ganado caprino, donde además, se podrían incluir otras enfermedades como la Tuberculosis y la Artritis-encefalitis.

No parece exagerado afirmar que todas ellas constituyen en la actualidad, el principal escollo para garantizar el rendimiento económico de una explotación.

Otros factores sobre los que evidentemente van a influir conciernen a las transacciones y circulación de animales vivos. En concreto y para Paratuberculosis, la legislación vigente exige un certificado de exención de la misma, para aquel ganado que vaya a concurrir a concursos o subastas (OM 17 Marzo 1988, BOE 22 Marzo 1988).

Debido a las características propias de estas enfermedades, los tratamientos cuando existen, tienen pocas probabilidades de ser administrados ya que resultan antieconómicos. Por otro lado, la vacunación no garantiza la eliminación de la infección de un rebaño. Todo ello genera un gran cantidad de animales portadores, enfermos crónicos y subclínicos con altas tasas de eliminación de microorganismos, lo que dificulta aún más la eliminación de estos procesos (Lopez, 1989, Juste, 1990c).

Para el control de las enfermedades de tipo crónico han de realizarse campañas de saneamiento, empleando métodos diagnósticos eficaces. Este hecho no es siempre posible, ya que para algunas de estas enfermedades aún no están plenamente conseguidos. Entre ellas se encontraría la Paratuberculosis (Juste y col. 1989, Merkal, 1989, Ordas y col 1989).

Aún más, el planteamiento de una posible política de erradicación parece inviable dados, el costo económico que ello supondría y las cifras de prevalencia e incidencia de la enfermedad en nuestro país (Garrido, 1987, Collins y col. 1991).

Quizá la manera más viable de intervención para garantizar la supervivencia económica de los rebaños, sería intentar disminuir la incidencia clínica de la enfermedad y combinar programas de higiene rigurosa y métodos de producción adecuados. La disminución de las posibilidades de contagio, el sacrificio de los animales afectados o sospechosos, la vacunación y unos adecuados métodos de detección son la clave para ello (Jorgensen, 1983 y 1987, Compaire y col. 1986, Tejedor, 1986, Aduriz y col. 1989, Molina y col. 1990a, Mendez y col. 1991).

La situación actual de la enfermedad en nuestro país, desde el punto de vista estadístico, es poco conocida. Los datos clínicos en cuanto a frecuencia de presentación son escasos. En algunas autonomías se han realizado estudios sobre rebaños afectados para estimar el número de animales afectados, la presentación de lesiones macro y microscópicas o bien establecer las cifras de prevalencia mediante serología. Los resultados de que se dispone son muy heterogéneos, oscilando entre un 14,08% de incidencia (Fuentes, 1988c) para el caso de la zona central y un 0% para el caso de Canarias (Leon y col. 1984, Badiola y col. 1986 y 1988, Guijarro y col 1989, Perea y col. 1990a).

La enfermedad ha sido puesta de manifiesto en Aragón, Cataluña, Extremadura, Castilla-León, Castilla la Mancha, Baleares, Madrid, Andalucía y Cantabria (Conclusiones II Reunión sobre Paratuberculosis en España, Derio, 1987), sin embargo los datos de distribución de vacuna facilitados por el M.A.P.A. (tabla nº 1) indican su extensión por todo el territorio nacional con la excepción de Canarias.

Nuestro ejercicio de la profesión veterinaria como clínico en la provincia de Segovia, fundamentalmente la zona Centro-Norte, nos sugería una amplia implantación de esta enfermedad. Al mismo tiempo, y a partir de los datos del M.A.P.A. acerca de la distribución de dosis vacunales frente a la Paratuberculosis de pequeños rumiantes, observamos que la comunidad autónoma de Castilla y León era una de las más

demandaba este tipo de productos en relación al número de efectivos censados. Por todo ello, nos decidimos a estudiar el problema.

TABLA nº 1

**VACUNA DISTRIBUIDA EN EL QUINQUENIO 1987-91 POR CC.AA. EN
RELACION A SU CENSO (1989)**

COMUNIDAD AUTONOMA	DOSIS/1000 CABEZAS
1.- ANDALUCIA	11.13
2.- ARAGON	4.37
3.- ASTURIAS	25.02
4.- BALEARES	24.06
5.- CANARIAS	0
6.- CANTABRIA	0
7.- CASTILLA LA MANCHA	33.43
8.- CASTILLA Y LEON	31.20
9.- CATALUÑA	7.33
10.- EXTREMADURA	16.47
11.- GALICIA	10.13
12.- MADRID	24.78
13.- MURCIA	21.37
14.- NAVARRA	17.83
15.- RIOJA	5.49
16.- VALENCIA	0
17.- PAIS VASCO	1.4
MEDIA NACIONAL	19.51

FUENTE: Elaboración propia a partir de datos del M.A.P.A.

I.2. ENFERMEDAD DE JOHNE O PARATUBERCULOSIS.

La Paratuberculosis ovina (PTBC) también se denomina enfermedad de Johne. Se trata de una enteritis granulomatosa de curso crónico causada por Mycobacterium paratuberculosis ó Mycobacterium johnei. El proceso afecta a los rumiantes y en el caso del ganado ovino a animales de más de un año de edad.

Se caracteriza por una disminución manifiesta de la capacidad productiva que se induce por un proceso de malabsorción nutritiva a nivel intestinal. Esta malabsorción finalmente conduce por movilización de todas las reservas orgánicas a un estado de caquexia.

Durante el curso de la enfermedad existe un adelgazamiento paulatino y la aparición de edemas sobre todo en la región submaxilar y pectoral así como ascitis debido a un trastorno circulatorio.

En algunos casos, cursa con diarrea y este signo suele orientar hacia un pronóstico más desfavorable aún. No suelen existir síntomas generales como elevación de temperatura, ni disminución del apetito, sin embargo las mucosas están anormalmente pálidas y puede aparecer caída de lana (Timoney y col. eds.1988).

I.3. ANTECEDENTES HISTORICOS.

La primera referencia de un proceso de enteritis crónica en ganado bovino fue realizada en Francia por Hutrel D'Arboual en 1826. En Inglaterra en 1831 Farrow y Cartwrigth describen un episodio de enfermedad crónica caquectizante, también en ganado bovino, y Bang en 1875 otro proceso crónico intermitente utilizando ya para su diagnóstico un método de tinción de la mucosa intestinal. Sin embargo, hasta el año 1895 no se puso de manifiesto que este proceso era una enfermedad diferente de la Tuberculosis.

Fueron Johnne y Frothingham quienes establecieron esta conclusión, al observar la presencia de bacterias ácido alcohol resistentes en muestras procedentes de un bovino enfermo y enviándoselas así mismo a Koch para conocer su opinión. Koch estimó también que se trataba de un proceso distinto al de la Tuberculosis eliminándose así el concepto existente hasta entonces, de clasificación como otra forma clínica de esta última enfermedad.

Bang en 1905 reproduce experimentalmente la enfermedad en animales de laboratorio y ganado vacuno administrando por vía oral trozos de mucosa intestinal procedente de animales enfermos y sugiere el nombre de Paratuberculosis.

Twort e Ingram en 1913 logran cultivar el agente en el laboratorio utilizando un medio sólido a base de huevo al que añaden glicerina y bacilos tuberculosos muertos.

En ganado ovino, la primera descripción corresponde a Vukovic en 1908, sin embargo aparte de estas dos especies existen descripciones de la enfermedad en otros rumiantes. McFadyean en ciervos en 1907 y McFadyean y Sheather en cabras en 1916. Posteriormente, se determinó su presencia en otras especies silvestres (Riemann y col. 1979).

En la especie humana se han descrito aislamientos de bacterias micobactín dependiente a partir de pacientes con la enfermedad de Crohn, sin que su significación epidemiológica haya sido clarificada (Thayer y cols. 1983).

En algunos países con gran tradición ganadera ovina como es el caso de Australia, la notificación de la presencia de esta enfermedad en rebaños comerciales es relativamente reciente, aunque ya había sido descrita previamente en caprino (Lenghaus y col. 1977, Seaman y col. 1984).

En España Roca-Soler describió por primera vez el proceso en 1935 en ganado vacuno. Sin embargo, para el ovino no se describe hasta 1973 por Aller y cols.. Por otro lado, en 1978 Garrido y León notifican la presencia de algunos focos en el suroeste de la península en ganado caprino.

I.4.- ETIOLOGIA

I.4.1.- LAS MICOBACTERIAS

Etimológicamente el término micobacteria procede de: myces= hongo y bakterion = pequeño bastón, queriendo significar bacterias semejantes a los hongos. Las micobacterias se encuentran incluidas dentro del Orden ACTINOMICETALES dentro de la Familia MYCOBACTERIACEAE, que posee un único género MYCOBACTERIUM. Estos microorganismos miden aproximadamente 0.2-0.6 " 1-10 μ y pueden organizarse en forma de filamentos o pseudomicelio (Goodfellow y col.1984, Sneath y col. 1986).

Se consideran Gram positivas si bien no se tiñen estrictamente mediante este método, incluso algunos autores encuentran una mayor semejanza entre la estructura de su pared y la de los Gram negativos (Rastogi y col. 1990).

Son aerobias, inmóviles y no forman esporas, ni conidios, ni hifas. Tampoco poseen cápsula y son fuertemente ácido-resistentes. Por otro lado, resultan escasamente sensibles frente a la acción de la mayor parte de los antibióticos. En contraste, algunas cepas de M. avium se comportan como sensibles a la Penicilina (Hawkins, 1984).

Presentan forma bacilar recta o algo curvada. Este grupo, incluye parásitos obligados, saprofitos y formas intermedias (Sneath 1986).

Su gran resistencia a factores externos ambientales, entre los que destaca la ácido-alcohol resistencia y la resistencia a los fármacos convencionales frente a las eubacteriales, se debe a su gruesa pared lipídica. En la composición de esta pared el 60% está representado por sustancias de tipo lipídico, e incluye ácidos micólicos y sus ésteres con largas cadenas ramificadas. Los ésteres de estos ácidos micólicos se caracterizan por ser insolubles en etanol, y su estructura resulta más compleja que los

integrantes de los géneros *Nocardia*, *Corynebacterium* o *Rhodococcus*, con quienes se encuentran relacionadas (Petit y col. 1984).

Su tiempo de generación es de 2 a más de 24 horas, con lo que en un medio de cultivo óptimo aparecen colonias visibles desde 2 días en los mejores casos, a 8 semanas o más. Esta característica se utiliza para dividir taxonómicamente las especies de este género en dos grupos: **las micobacterias de crecimiento rápido** en las que la formación de colonias se produce en menos de una semana; y **las de crecimiento lento**, que tardan más de una semana en producir colonias (Wayne, L.G. 1984).

Mediante técnicas de homología del DNA se han diferenciado también dos grupos de especies que, salvo excepciones, coincide con la anterior división fenotípica en función del periodo de crecimiento. También, según el porcentaje molar de los nucleótidos Guanina-Citosina, ha descrita una distribución bimodal que no se corresponde con la división fenotípica anteriormente citada (Hurley y col. 1988, Rogall y col 1990a).

Los medios de cultivo sintéticos suelen utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono, además de sales minerales, si bien se utilizan mucho medios con huevo (entero o yema) o suero (Ratledge, C. 1984).

La temperatura óptima de crecimiento oscila según las especies entre los 30 y los 45°C. Algunas de ellas para su cultivo requieren suplementos de forma imprescindible, como la hemina, la micobactina u otros transportadores del hierro. En contraste, el *Mycobacterium leprae*, agente productor de la lepra humana, aún no ha podido ser cultivado en un medio sintético (Segal, W. 1984).

A fin de captar el hierro del medio externo y que pueda atravesar la pared celular, las micobacterias elaboran diversas sustancias denominadas "sideróforos". Intervienen en la captación y el transporte extracelular del hierro y el transporte a través de la pared (Ratledge, C. 1984).

Las micobacterias son resistentes a la mayoría de los antibióticos de uso común, excepto a la estreptomicina y la rifampicina. Los fármacos empleados frente a ellas (cicloserina, etambutol, isoniazida,...) son muy específicos y poseen escasa acción inhibitoria frente a otras especies de micobacterias (Hawkins, J.E. 1984).

I.4.2.- Mycobacterium paratuberculosis (Bergey & col. 1923).

Es el agente causal de la enfermedad que nos ocupa y también se denomina Mycobacterium johnei. Entre sus características más destacables se encuentran la de ser ácido alcohol resistente, poseer un tamaño aproximado de 1-2 μ de longitud por 0.5 μ de anchura y presentar una gruesa pared lipídica, semejante a las del resto de las micobacterias. Empleando el método de tinción de Ziehl-Neelsen suele adquirir una coloración uniforme, aunque a veces pueden observarse formas alargadas con fragmentos sin teñir. Así mismo, suelen aparecer agrupados formando "nidos" sobre todo en las preparaciones a partir de material patológico (Timoney y col. 1988).

Posee una gran resistencia en el medio ambiente y pertenece al grupo de las micobacterias de crecimiento lento con requerimientos especiales.

I.4.2.1.- CULTIVO

La principal necesidad para el crecimiento de este microorganismo, es la presencia de **micobactina** en el medio para su primo-aislamiento.

Las Micobactinas son compuestos liposolubles, que generan las micobacterias para el transporte del hierro a través de la pared celular. Otros agentes quelantes del hierro como el ácido salicílico o las exoquelinas son hidrosolubles, y pueden captar hierro a partir del medio transfiriéndolo a las micobactinas. Estas últimas, de mayor poder quelante, lo liberan al interior celular donde enzimáticamente (óxido-reductasa-ferrimicobactina (NADPH)) ese transformado de férrico insoluble a ferroso soluble. Algunos de los sideróforos citados no pueden ser utilizados por distintas especies de micobacterias (Merkal y col. 1981, McCullough y col. 1982, Ratledge, C., 1984).

La característica de la micobactin-dependencia puede perderse mediante pases sucesivos en medios sintéticos (como el de Watson-Reid pH 5.5), o con la adición de citrato amónico férrico (1%) (Merkal y col., 1982).

I.4.2.2.- IDENTIFICACION

El lento desarrollo y la necesidad de micobactina no resultan en la actualidad insuficientes para una identificación de especie. La morfología y la tinción pueden servir de ayuda, pero la semejanza con M. avium (algunas cepas son así mismo micobactín-dependientes) hacen dificultosa la caracterización. Sin embargo, el crecimiento de esta última especie es algo más rápido, pudiendo observarse ya el desarrollo de colonias hacia la primera o segunda semana del cultivo.

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación convencional de bacterias, no son aplicables a las micobacterias. Entre las pruebas más útiles y frecuentemente utilizadas destacan: la prueba de la catalasa, la prueba de la niacina, el test del rojo neutro, la hidrólisis del tween 80, la reducción de los nitratos y la prueba de la fosfatasa alcalina. Sus resultados no suelen ser concluyentes, al igual que los métodos serológicos.

La sensibilidad frente a antimicrobianos puede así mismo servir de ayuda para la identificación, sin embargo también existe variabilidad entre las cepas de una misma especie.

El análisis cromatográfico de los lípidos de la pared celular, puede resultar útil para una identificación más estricta, si bien no se han encontrado ácidos grasos específicos para M. paratuberculosis (Brennan y col. 1983). Sin embargo, Damato y col. (1987) mediante cromatografía en capa fina diferencian M. paratuberculosis de otras micobacterias, y mediante cromatografía de gas-líquido lo distinguen del grupo M. avium - M. intracellulare. Así mismo estos mismos autores empleando métodos radiométricos sobre cultivos en Middlebrook-7H12 demuestran la micobactina-dependencia en un periodo de ocho días.

Chiodini (1986b) tras utilizar pruebas bioquímicas y de susceptibilidad a antimicrobianos llega a la conclusión de que ayudan a la identificación pero, dada su variabilidad, el grado de crecimiento y la dependencia de la micobactina siguen siendo el mejor criterio para la identificación.

Thorel y col. (1988) proponen el uso de la infección experimental en pollo, conejo o vaca para diferenciar el M. paratuberculosis del Mycobacterium "paloma torcaz" y el M. avium.

Las técnicas de hibridación y homología del DNA son las que permiten una más elevada diferenciación del microorganismo. Según Whipple y col. (1990) empleando este tipo de tecnología no solo es posible identificar la especie, sino también la de diferentes cepas de M. paratuberculosis hasta la actualidad difícilmente clasificables (Levy-Frebault y col. 1989, Rogall y col. 1990b, Saxegaard y col. 1988a).

Existe una gran afinidad entre las especies micobactín dependientes. Saxegaard y col. (1988) encuentran más del 90% de homología entre el DNA de M. paratuberculosis y el de M. avium, llegando a considerar al primero como subespecie del segundo. De modo semejante ocurre con con el M. "paloma torcaz" al que estos autores denominan M. avium subesp. columbae.

Hurley y col. (1988) y Yoshimura y col. (1988) ambos empleando hibridación DNA-DNA, consideran que todas las micobacterias micobactín-dependientes deberían estar integradas en un solo grupo de microorganismos dentro del complejo M. avium, dada su gran semejanza.

Por último, la reacción en cadena de la polimerasa a partir del fragmento IS900 del DNA o la secuencia 16S del RNA-ribosomal permite diferenciar especies. Su sensibilidad es comparable a la del cultivo, posee una gran especificidad y sobre todo una mayor rapidez, además solo se requiere un número inferior a 10.000 bacterias (Vary y col. 1990, Rogall y col. 1990a).

I.4.2.3.- VARIEDADES.

Desde el punto de vista de la Patología animal sigue estando vigente la clasificación de Taylor (1950), quien distingue tres variedades de M. paratuberculosis en función de su origen:

* **Tipo bovino** integrada por cepas no pigmentadas.

* **Tipo ovino** con cepas pigmentadas, que incluso confieren coloración amarillenta a los tramos intestinales afectados clínicamente. Suelen ser cepas de origen escocés, también detectadas en España (Marco, 1990). Así mismo, han podido aislarse cepas pigmentadas a partir de ganado vacuno (Stuart, 1965).

* **Tipo disgónico** con cepas de origen ovino, aisladas inicialmente en Islandia. Presentan gran dificultad e incluso imposibilidad para su crecimiento en medios de cultivo.

Thorel y col. (1979) en Francia y Gunnarsson y col. (1979) en Noruega pusieron de manifiesto diferencias culturales con cepas de origen caprino, en desacuerdo con la clasificación de Taylor.

Por otro lado, Saxegaard (1990) mediante la infección de terneros con cepa caprina no consiguió el desarrollo de la enfermedad ni tampoco constató la presencia de seropositividad en los animales inoculados. Tan solo obtuvo la identificación del germen a partir del análisis intestinal tras el sacrificio. Sin embargo, el ganado caprino infectado sí desarrolló enfermedad detectándose la presencia de anticuerpos.

En nuestro país Juste y col. (1989b) observaron que las cepas de origen ovino aisladas en su estudio, presentaron diferencias culturales con respecto a las de origen bovino, aunque mostraron una mayor dificultad para su crecimiento.

A pesar de todas estas investigaciones, las diferencias evidenciadas fueron sólo fenotípicas, no habiéndose demostrado variaciones bioquímicas o antigénicas entre estas cepas. Sin embargo, Camphausen y col. (1988) mediante cromatografía, detectaron (solo en algunas cepas de campo) la presencia de un antígeno glucopeptidolipídico no diferenciable del que contiene M. avium serovar 8. Este hecho apoya la duda con respecto a la homogeneidad del taxón M. paratuberculosis (Vary y col. 1990, Rogall y col. 1990b, Whipple y col. 1990).

I.4.2.4.- RESISTENCIA.

El M. paratuberculosis es una bacteria capaz de permanecer viable durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente. Se ha descrito su presencia en el pasto tras 11 meses, en aguas estancadas o cenagosas después de 9 meses y en agua de río tras 6. Así mismo, el análisis de material biológico a largo plazo ha evidenciado supervivencias de más de 11 meses en heces de ganado bovino, 252 días en purín a 5°C y 98 días en purín a 15°C (Chiodini y col. 1984, Jorgensen, 1977). Por el contrario, la orina presenta un efecto bactericida, no permaneciendo viable más allá de una semana.

La luz solar directa ejerce una acción negativa en cuanto a su resistencia, de modo semejante a lo que ocurre con los suelos alcalinos y con elevado contenido en calcio. En contraste, los suelos con pH ácido favorecen su viabilidad (Blood, 1987).

Entre los desinfectantes de acción rápida (menos de diez minutos de inactivación) frente a M. paratuberculosis destacan el formol, los cresoles, el fenol, el bicloruro de mercurio y el hipoclorito cálcico. Las heces secas protegen a esta micobacteria frente a los desinfectantes, por que se recomienda la incorporación de algún agente detergente (Delanne, 1966, Carter, 1984, Kimberling, 1988).

I.5.- EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

Las especies más receptivas son los rumiantes, en particular el ciervo, entre los silvestres. La infección experimental se suele llevar a cabo realizar por vía oral o intravenosa; la infección por vía subcutánea produce tan solo un granuloma local en el punto de inoculación. Siempre el desarrollo de enfermedad precisa largos períodos de incubación (Riemann y col. 1979, Gilmour y col. 1989).

Se han utilizado para llevar a cabo infecciones experimentales prácticamente todas las especies de laboratorio, obteniéndose los mejores resultados en hámster (Gilmour, 1965). En la mayor parte de estos animales se multiplica sin generar sintomatología clínica; sólo se han observado lesiones semejantes a las de los rumiantes en el ratón, donde también se puede observar alteración hepática. En el conejo pueden aparecer lesiones pulmonares (Chiodini y col. 1984, Saxegaard y col. 1990).

La enfermedad está presente en mayor parte de los países del mundo, y en España se encuentra distribuida por toda la península a excepción de las islas Canarias. La incidencia es muy variable, pero según McNab y col. (1991b), mediante muestreos sistemáticos de población empleando diversas pruebas diagnósticas, no es posible predecir el grado real de infección sobre una base individual.

El contagio se produce principalmente durante los primeros meses de vida por vía fecal-oral a partir sobre todo de las heces que contaminan la ubre de la propia madre o de compañeras del rebaño. La transmisión de la infección ha sido demostrada por vía transplacentaria y venérea, esta última tendría una escasa importancia desde el punto de vista epidemiológico, no así en el primer caso. Así mismo parece probable la transmisión a través de la leche, aunque no se ha demostrado (Balaquer y col. 1987).

Los animales jóvenes resultan más receptivos a la infección. Los adultos pueden adquirirla a partir sobre todo de pastos o aguas contaminadas, éstos sin embargo no desarrollarán la enfermedad. Desde el punto de vista epidemiológico este hecho tiene gran importancia, ya que se pueden convertir en portadores, favoreciendo nuevos contagios. Además de la precocidad, con respecto al contagio, también es importante la dosis infectiva (Garrido, 1987).

Otros rumiantes domésticos actuar como portadores, tanto si padecen enfermedad clínica, como si no. Saxegaard (1990) observó que los terneros infectados con cepa caprina no desarrollaban la enfermedad, en cambio resultaban seropositivos, pudiéndose aislar el M. paratuberculosis a partir de su intestino.

Entre las especies no rumiantes el cerdo también puede actuar como portador. Por otro lado, en un gran número de rumiantes salvajes se ha identificado la presencia de la enfermedad. Estas especies constituirían un grupo reservorio de "ciclo silvestre", sobre todo cuando se comparten pastizales con los ovinos.

Se han descrito diversos aislamientos de esta micobacteria a partir de heces en otras especies de no rumiantes, como son el ratón de campo o el conejo de monte (Levi, 1950, Fuentes y col., 1988b). Todas las especies silvestres serían responsables de la difusión y presencia continuada del agente y ello junto a la gran resistencia del mismo en el medio ambiente, harían muy difícil la eliminación de la enfermedad en una determinada zona afectada, como ha sido puesto en evidencia en reiteradas ocasiones (Moyle, 1975, Merkal, 1984, Saez de Ocariz, 1987, McNab y col. 1991b).

También se ha observado la presencia de la enfermedad en primates sin contacto previo con rumiantes. Esta observación abriría un nuevo campo de posibilidades desde el punto de vista de la salud pública, entre las que destacaría la posible afección del hombre. De hecho existen grandes analogías entre la clínica de los pacientes con enfermedad de Crohn y la de los animales enfermos de paratuberculosis. Así mismo, existe una gran semejanza entre el ADN de la micobacteria aislada a partir de algunos pacientes humanos y el de M. paratuberculosis. Por último, los enfermos de Crohn ofrecen mayores títulos frente a paratuberculosis, mediante una prueba ELISA, que la población normal (Thayer y col., 1983, Juste y col., 1989c, Van Kruiningen y col. 1991).

En cualquier caso, la relación entre infección y enfermedad no está muy clara, dependiendo fundamentalmente de factores inmunológicos y de la resistencia del animal en la que influirían factores nutricionales y de manejo.

En este sentido cabe mencionar el hecho de que se puede observar una mayor incidencia de enfermedad, en animales que pastorean sobre suelos ácidos. Lo que podría justificarse en base a la mayor dificultad para captar el hierro a este pH. También parecen disminuir la incidencia el abonado con fosfatos o la administración de fósforo en la ración, o la disposición "ad libitum" de complejos vitamínico-minerales (Delanne y col., 1966, Kopecky, 1977, Garrido, 1987, Fuentes, 1988). Por último, se ha descrito que algunas enfermedades concurrentes como las parasitosis o las infecciones por Corynebacterium sp favorecen la presentación de la enfermedad (Garrido, 1987).

I.6.- PATOGENIA

De modo semejante a lo que sucede durante el curso de la infección por otras micobacterias, inicialmente se desarrolla "complejo primario". Este, puede establecerse en las tonsilas y los ganglios retrofaríngeos, ya que la vía de entrada del agente suele ser la oral. A partir del complejo primario se produce la diseminación a órganos diana como: el intestino y los ganglios mesentéricos, desapareciendo posteriormente el bacilo de su localización inicial. Sin embargo, de forma habitual el desarrollo de este complejo tiene lugar en el intestino delgado (zona terminal del ileon) y los ganglios mesentéricos.

Esta localización inicial en el intestino parece obedecer al máximo desarrollo de la placa de Peyer durante las primeras semanas de la vida, abarcando el 80% de la superficie del final del intestino delgado. La penetración en la mucosa intestinal parece realizarse de forma pasiva (hacia los folículos de la placa de Peyer) a partir de las células "M", situadas entre los folículos y la luz intestinal y encargadas de la captación de los antígenos. Estas células transferirían las micobacterias a los macrófagos subepiteliales, quienes las conducirían al interior de la placa de Peyer (Momotani y col., 1988, Garcia Marin y col., 1989, Juste 1990d).

En el interior de los macrófagos estas bacterias se multiplicarían de forma lenta pero constante, produciendo un muy leve efecto lítico en ellos debido a la ausencia en la producción de toxinas (Merkal, 1984a).

El posterior desarrollo de la enfermedad dependerá de la respuesta inmunitaria del hospedador. Esta última puede ser muy variable, así los animales infectados pueden presentar una respuesta celular y/o una respuesta humoral, o desarrollarse un estado de anergia.

Inicialmente, la respuesta inmune es de tipo celular, después, al progresar la enfermedad, se inicia la respuesta humoral. Suele existir una relación inversa entre ambos tipos de respuesta y además la inmunidad se desarrolla de forma independiente de los sucesos clínicos.

El mecanismo de anergia no está suficientemente estudiado, parece resultar de la liberación, por parte de los macrófagos, de factores solubles de modo semejante a lo que ocurre en la lepra humana. Uno de estos factores se ha comprobado que suprime "in vitro" los fenómenos de transformación linfocitaria (Chiodini y col. 1984). Así mismo, se ha observado una alteración de la funcionalidad en linfocitos T, mediada por productos derivados del ácido araquidónico (Thoen y col. 1988).

Diversos autores describen en función del tipo de respuesta predominante humoral y/o celular, tres tipos de reacciones orgánicas (Chiodini y col. 1984, Garcia-Marin, 1990):

- una reacción de tipo "tuberculoide", con gran proliferación celular, que limita el crecimiento de la micobacteria, pudiendo incluso llegar a su eliminación.
- una reacción de tipo "lepromatoso", caracterizada por una situación de anergia, esto es animales tolerantes a la infección. Ello, limita los daños en el organismo, pero al mismo tiempo facilita la multiplicación de la micobacteria, produciéndose una gran eliminación a través de las heces.
- reacciones "intermedias", caracterizadas por una respuesta inicial de base celular más o menos intensa, pero que no logra eliminar la infección.

La enfermedad se desarrolla debido al proceso inflamatorio granulomatoso crónico en la mucosa intestinal. El M. paratuberculosis no produce toxinas como el M. tuberculosis, no causa gran daño ni destrucción celular. Su acción patógena se debe a su multiplicación, y la enfermedad se relaciona con fenómenos de hipersensibilidad (Timoney y col. 1988).

Como anteriormente se comentó, la multiplicación en los macrófagos origina la liberación de factores solubles que provocan la llegada de más células inflamatorias, originándose fenómenos de transformación celular, como es el caso de las células gigantes (Gilmour y col. 1965).

En este foco inflamatorio se compromete el drenaje vascular y linfático, produciéndose una importante exudación. La alteración de la funcionalidad y el fisiologismo intestinal provocan malabsorción, lo que justifica no sólo los fenómenos diarreicos crónicos, sino el progresivo adelgazamiento del animal. La pérdida de proteínas plasmáticas originará un balance de nitrógeno negativo.

Este mismo déficit proteico es la causa del edema hipooncótico que se observa en algunas zonas declives.

La reacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar en el seno del tejido infectado, induce la liberación de histamina, sustancia que intervendrá en la aparición de la diarrea, los edemas, la producción de estertores, el aumento de secreción conjuntival, y en algunos cambios hematológicos. Se ha descrito que la administración de antihistamínicos reduce o anula alguno de estos síntomas, recidivando al cesar el tratamiento (Cuervo, 1990).

En ovino la hipoproteïnemia se compensa con una mayor producción proteica por parte del hígado, los signos clínicos aparecen cuando falla este mecanismo (Allen y col. 1974).

Durante la gestación se ha podido observar una cierta mejoría desde el punto de vista clínico (ganancia de peso, desaparece la diarrea) reapareciendo la enfermedad tras el parto. Ello se justifica en base a los cambios inmunológicos acaecidos durante la gestación que tienden a proteger al feto, ejerciendo también cierta protección sobre la madre (Gasca, 1989).

Finalmente, se puede producir una diseminación linfógena y hematógena del microorganismo originándose lesiones granulomatosas en diversos órganos como la glándula mamaria, el útero, el hígado, el bazo, el riñón, etc (Hines y col. 1987).

La infección uterina es muy frecuente, observándose incluso en pacientes sin síntoma alguno de enfermedad (McQueen, 1979, Muhammed y col. 1979).

También se ha descrito la presencia de lesiones arteriales debidas a la degeneración de fibras de elastina. Ello se relaciona con una deficiencia en cobre a causa de la ausencia de su absorción intestinal (Simpson, 1966).

En la lesión paratuberculosa hay acumulación de hierro secuestrado en leucocitos o macrófagos, dicha acumulación no se ve afectada por la suplementación de este mineral. Sin embargo, el aporte férrico en la dieta sí se correlaciona positivamente con la emisión a través de las heces de M. paratuberculosis (Lepper y col, 1989).

I.7.- SINTOMATOLOGIA

En ovino el síntoma más característico y frecuente, y a veces el único, es el adelgazamiento progresivo común a muchas otras enfermedades. Sin embargo, la administración de tratamientos antiparasitarios, la edad de los enfermos, su curso clínico y las características epidemiológicas del conjunto de animales enfermos en un rebaño permiten

establecer un diagnóstico presuntivo (Timoney, 1988).

El período de incubación es variable, admitiéndose en la especie ovina doce meses como media, desde que tiene lugar la infección a la aparición de los primeros signos.

La enfermedad clínica puede considerarse como el estado terminal de una infección crónica subclínica. Este desenlace se suele precipitar debido a diversos tipos de factores, como estrés, de tipo fisiológico (partos), bajo plano nutricional, alta presión productiva, parasitismos, desequilibrios minerales en las dietas, etc. (Chiodini y col., 1984).

Inicialmente, desde el punto de vista de la colectividad del rebaño, se puede observar una disminución de las producciones, más fácilmente valorable en ovejas en ordeño, aunque, también se puede constatar una disminución en índices reproductivos, todo ello sin causa aparente. Así, no suelen existir signos de postración, ni pérdida de apetito, ni hipertermia. Posteriormente, se observa pérdida de masa corporal que se instaura de forma progresiva y que no suele ser recuperable (Lepper y col. 1989).

Puede aparecer diarrea acuosa y sin esfuerzo, de color verde oscuro, pero este síntoma no es constante, siendo más frecuente en las etapas terminales. Carrigan y col. (1990) observan en su estudio la presencia de diarrea grave en el 20% de los ovinos afectados, y heces no peletizadas en el 25%. El hecho de que, al contrario que en ganado vacuno, la diarrea no sea un síntoma característico se atribuye a la gran capacidad de reabsorción de líquido que presenta el intestino grueso de la especie ovina (Blood y col. 1988).

El edema de papada es un signo más frecuente y más precoz que la diarrea, también se pueden observar edemas en párpados, labio superior, y otras regiones declives.

Los animales presentan mal pelaje, con fácil desprendimiento de la lana; las mucosas están pálidas debido a la anemia.

Dentro de la cronicidad, el curso de la enfermedad es variable, entre seis y doce/dieciséis meses de duración, si bien puede existir una fase estacionaria durante largo tiempo. La letalidad es elevada, habiéndose citado pocos casos de curación (Kimberling, 1988).

Finalmente, las ovejas caminan con marcha envarada y puede haber ligera elevación de la temperatura que alterna con periodos de normalidad. En las etapas finales dejan de comer, si existía diarrea, ésta, se hace más profusa y maloliente y la muerte se produce debido a la caquexia. Sin embargo, el hecho más habitual es que la res se sacrifique antes de llegar a este último estadio.

La enfermedad se suele observar en animales de más de dos años, en aquellos menores de un año es infrecuente. En los casos descritos dentro de esta última edad, probablemente la infección se produjo vía intrauterina (Cuervo y col. 1987).

Se ha descrito una forma septicémica que cursa con enteritis hemorrágica aguda (Taylor, 1951).

I.8.- LESIONES

En primer lugar, se debe considerar que no existe una relación directa entre la sintomatología que presenta un animal enfermo de paratuberculosis, y la gravedad de las lesiones observadas. Tampoco, existe correlación entre el desarrollo de la lesión y el número de micobacterias presente en la misma (Cuervo y col., 1987).

I.8.1.- LESIONES MACROSCOPICAS.

El cadáver de aquellos animales han padecido la enfermedad y esta ha presentado un curso prolongado, mostrará evidentes signos de emaciación con diversos grados de caquexia y atrofia de las masas musculares. Las mucosas suelen estar pálidas debido a la anemia normocrómica.

En la necropsia además de comprobarse la atrofia muscular, se evidencia la abolición de los depósitos grasos orgánicos (incluso en el surco coronario) y la presencia de una "atrofia serosa", en la región cardíaca, la médula osea y la pelvis renal (Badiola y col. 1986).

Los edemas de tipo hipooncótico son un hallazgo frecuente en la cavidad abdominal (ascitis), los ganglios linfáticos, la pared de los vasos, la serosa intestinal y el mesenterio. Otras veces pueden localizarse en la región submaxilar, los párpados, los labios y la region pectoral.

En el tramo digestivo se encuentra normalmente afectada la parte final del ileon y el ciego, destacando la zona de la válvula ileo-cecal. Las lesiones pueden extenderse a yeyuno y colon, y en algunos casos más graves a todo el intestino.

Desde el punto de vista macroscópico, puede observarse la presencia de pequeñas nodulaciones en la mucosa de las zonas afectadas, un gran engrosamiento de la misma acompañado de edema, arrugamiento y fragilidad. Su aspecto ofrece un granulado superficial con petequias semejando las circunvoluciones cerebrales.

El plegamiento característico de la mucosa no suele estar presenta en el ganado vacuno. Las lesiones macroscópicas aparecen, en esta especie, más en sentido longitudinal que transversal a lo largo del intestino.

También en la mucosa puede observarse una cierta tonalidad amarillo-naranja cuando la infección ha tenido lugar con una cepa pigmentada (Juste , 1984, Martin, 1988).

En algunas ocasiones, se ha descrito la presencia de una enteritis hemorrágica en animales jóvenes (Cuervo y col., 1987).

Las lesiones intestinales pueden aparecer como difusas o segmentales. En este caso, las zonas engrosadas se observan netamente diferenciadas de las normales, pudiendo alternarse los segmentos afectados a lo largo del intestino.

La serosa suele aparecer brillante y húmeda, evidenciándose los vasos linfáticos turgentes, con trayectoria irregular. También puede observarse, a veces, la presencia de nodulaciones blanquecinas, que tienden a caseificarse o calcificar ofreciendo una imagen perlada.

En el ganado ovino, los ganglios mesentéricos presentan casi siempre alguna alteración, incluso cuando no se evidencia lesión intestinal. Su afección oscila desde una ligera tumefacción con aspecto edematoso y coloración verde oliva en la zona medular, sin neta separación entre ésta y la cortical, hasta la aparición de granulomas con focos necróticos caseificados de distintos tamaños semejantes a los de la tuberculosis. Esta última lesión no suele aparecer en ganado vacuno (Badiola y col., 1986).

El resto de la arquitectura orgánica no presenta lesiones significativas.

I.8.2.- LESIONES MICROSCOPICAS

Pueden ser de tipo nodular (tuberculoide) o difuso (lepromatoso). Mediante infección experimental se ha seguido la secuencia del desarrollo del cuadro lesional. Este, se inicia a nivel de las placas de Peyer con un aumento de la celularidad en áreas T-dependientes, siendo ya evidente hacia

los quince días post-infección (García Marin y col. 1989).

El engrosamiento de la pared intestinal se debe inicialmente a la infiltración celular de la mucosa y la submucosa. A nivel microscópico, las células mayoritarias del infiltrado son de tipo epitelioide, acompañadas inicialmente de linfocitos y células plasmáticas. Más adelante, se observa la presencia de células gigantes de tipo Langhans y diversos tipos de macrófagos. Cuando la cantidad de micobacterias aumenta, paralelamente se incrementa el número de células epitelioides (Timoney y col., 1988).

Los neutrófilos no suelen observarse en gran cantidad, ya que desaparecen al establecerse la cronicidad. Su presencia está en relación con la aparición de pequeños focos de necrosis (Carrigan y col, 1990).

La proliferación celular en la mucosa intestinal se inicia en las crestas de las vellosidades, extendiéndose a la lámina propia. Puede llegar incluso a obliterar la luz de las criptas, desapareciendo las vellosidades. La infiltración puede afectar a la submucosa y llegar a la muscular (Badiola y col, 1986).

Existe tendencia a la caseificación de las lesiones en la especie ovina (25% de los ovinos infectados según Chiodini y col., 1984), pero no suele existir en vacuno. La calcificación es rara.

La presencia de linfangitis es frecuente, apareciendo granulomas que hacen prominencia hacia la luz de los vasos, lo que provoca una oclusión parcial y a veces total de los mismos. También pueden desarrollarse focos de necrosis en la pared.

En los ganglios linfáticos pueden observarse lesiones semejantes a las descritas para la mucosa intestinal.

Se han descrito lesiones arterioscleróticas en las arterias mesentéricas y la aorta abdominal.

En riñón puede existir una afección glomerular de intensidad variable (Gilmour y col., 1983).

En ganado ovino se ha descrito una gran variabilidad en cuanto a la intensidad de las lesiones. En este sentido, suele aceptarse de forma implícita la antigua clasificación de Stamp y Watt (1954) con cuatro grados de afección (Cuervo, 1990):

- * el primero de ellos asociado a la infección por cepas pigmentadas, consideradas de mayor virulencia. Cursa con gran celularidad, sobre todo en la zona cecal, donde, en el seno de la lámina propia y la submucosa casi de forma única se observan células epitelioides cargadas de micobacterias. La infiltración puede ser moderada en los ganglios linfáticos.

- * un segundo grado de afección corresponde al desarrollo de lesiones focales, menor celularidad en la mucosa intestinal y a veces sin alteración de la submucosa. La célula predominante sigue siendo de tipo epitelioides, demarcando el foco los leucocitos. Los ganglios, sin embargo, suelen estar más afectados, con desorganización de la cortical e invasión de los senos por células epitelioides. Los vasos linfáticos pueden presentar diferentes grados inflamatorios. Se observa un elevado número de micobacterias.

- * Este tercer grupo se caracteriza por la presencia en la mucosa de células gigantes y focos de epitelioides, escasa lesión necrótica en submucosa, celularidad en los folículos linfoides y menor lesión de los ganglios linfáticos. Los vasos sin alteración o rara. Difícil observación de micobacterias y aislamiento dificultoso.

- * Por último, un cuarto grupo de características semejantes al anterior.

Por otro lado, Carrigan (1990) considera a este respecto tan solo dos grupos histopatológicos:

Grupo I: para aquellos tejidos que presentan una extensa infiltración celular epiteliode en mucosa y submucosa, donde pueden evidenciarse gran cantidad de micobacetriás. Correspondería a los dos primeros cuadros de la clasificación anterior.

Grupo II: para aquellos que presentan infiltración de la mucosa con menor cantidad de células epitelioides y mayor de linfoides.

I.9.- DIAGNOSTICO

I.9.1.- DIAGNOSTICO CLINICO-EPIDEMIOLOGICO.

Cuando se evidencian síntomas como emaciación progresiva, edemas en zonas declives, pérdida de la lana, etc., se debe proceder a realizar un diagnóstico diferencial con respecto a distintas parasitosis, deficiencias e intoxicaciones.

El curso de la enfermedad, la edad del animal y el fracaso de los tratamientos dietéticos y/o farmacológicos resultan bastante indicativos para sospechar de paratuberculosis (Mendez y col. 1991).

Los estudios biopatológico y bioquímico no proporcionan una información concluyente, y además en la especie ovina no proceden en términos económicos. Así, los cambios hemáticos como la anemia normocrómica, la hipoproteinemia, la hipomagnesemia, la neutrofilia, etc., son hallazgos comunes a otros procesos caquetizantes, por lo tanto no tienen valor diagnóstico (Allen y col., 1974).

El análisis minucioso del rebaño desde el punto de vista clínico, evolutivo y productivo, así como la información epidemiológica de otras colectividades dentro del mismo área, suelen ser suficientemente indicativos (Carrigan y col. 1990, Juste y col. 1990b, Collins y col. 1991). Esto último es importante, ya que puede darse el caso de que exista paratuberculosis en el rebaño, pero con tan baja incidencia de casos clínicos, que no lo relacionemos con la enfermedad y por tanto pase desapercibida (Balaguer y col., 1987, Manrique, 1988).

I.9.2. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

Es necesario y sencillo, además complementa al del apartado anterior, a nivel de campo. Las lesiones de esta enfermedad resultan bastante específicas, y sobre todo la realización de la necropsia permite descartar otras enfermedades crónicas, como la pseudotuberculosis, la adenomatosis pulmonar, etc (Molina y col., 1990b).

La presencia de pliegues y el engrosamiento de la mucosa intestinal, la opacidad de la pared intestinal, la dilatación de los vasos linfáticos con un trayecto irregular, la observación de nódulos, la hipertrofia y edema de los ganglios linfáticos mesentéricos, son lesiones que pueden orientarnos muy favorablemente con respecto al diagnóstico de la paratuberculosis.

A pesar de ello, existen casos en los que la sintomatología clínica es grave, y sin embargo las alteraciones macro y/o microscópicas no sean muy evidentes.

I.9.3. ETIOLOGICO

Consistiría en identificar el agente causal, pudiéndose emplear diversos métodos:

I.9.3.1. Bacterioscopia directa.

La puesta en evidencia de M. paratuberculosis puede realizarse, por métodos directos simples, a partir de extensiones de heces (con o sin concentración), frotis de mucosa intestinal o de ganglios mesentéricos, como muestras más indicadas. Sobre ellas, se realiza una tinción, empleando el método de Ziehl-Neelsen (Z-N). Esta, permitirá identificar la presencia de bacterias ácido-alcohol-resistentes, de aproximadamente 1 a 2 μ de longitud, agrupados en forma de "nidos" (Kimberling y col. .

Este método es rápido y sencillo y puede aplicarse aleatoriamente a un porcentaje significativo del efectivo. Nos proporcionará una información fiable acerca de la presencia de la infección en el rebaño. Sin embargo, es un método poco sensible, considerándolo como método único de diagnóstico sobre animal individual (Thoen y col., 1979, Summers, 1981, Seaman y col., 1984).

I.9.3.2. Histopatología.

En la especie ovina debido al bajo valor económico del individuo no se realizan biopsias, sino sacrificios de animales sospechosos para confirmar la enfermedad en el rebaño. Los distintos métodos histopatológicos suponen una gran ayuda en el diagnóstico de la enfermedad, complementan de forma útil otras técnicas que pudieran utilizarse y además permiten un diagnóstico individual.

El tipo de muestra idóneo es el mencionado en el párrafo anterior. Se suelen utilizar cortes histológicos convencionales teñidos mediante hematoxilina-eosina (H-E) o Z-N (Merkal y col., 1966).

También pueden emplearse diversas técnicas inmunocitoquímicas. Algunos de los métodos más utilizados son: la tinción mediante auramina-rodamina, basada en la aplicación sobre el corte histológico de anticuerpos anti

M.paratuberculosis asociados a un marcador fluorescente o químico que luego se revela para la visualización, o la tinción mediante avidina-biotina-peroxidasa (Molina y col., 1989, Perez y col., 1989, Navarro y col., 1991).

A veces, las técnicas inmunocitoquímicas pueden ofrecer un escaso porcentaje de positividad, en relación con el desarrollo de las lesiones histológicas, debido al bajo número de micobacterias presentes en la muestra. Por el contrario, poseen una mayor especificidad y puede cuantificarse en 2.5 veces mayor la sensibilidad, con respecto al método directo empleando Z-N (Navarro y col., 1989).

I.9.3.3. Aislamiento.

El aislamiento de M. paratuberculosis es problemático y además supone un gasto considerable de tiempo. Sin embargo, el crecimiento microbiológico e identificación de esta micobacteria es concluyente, no solo desde el punto de vista individual, sino también colectivo. Además hay que considerar que este método es uno de los recomendados para el control de la enfermedad, cuando se aplican programas de saneamiento (Gilmour y col. 1983, Williams y col., 1985, Saez de Ocariz, 1987, Juste, 1990c, Collins y col., 1991).

Para detectar la presencia de animales portadores debe existir una eliminación de al menos 100 bacterias por gramo. A pesar de que exista, en muchos casos puede fracasar el aislamiento. En cualquier caso, el cultivo microbiológico es la técnica más adecuada también, para detectar la infección en animales aparentemente sanos, que aún tienen valor económico (Chiodini y col. 1984).

Las cepas de origen bovino presentan un menor grado de dificultad para el crecimiento, que las de origen ovino (Taylor, 1951; Merkal, 1989; Juste y col. 1989b). Un ejemplo de ello, se refleja en un estudio de estos últimos autores,

quienes obtuvieron tan solo un 11% de crecimiento en el conjunto de los casos confirmados mediante tinción y/o histopatología.

Además de precisarse medios selectivos adicionados con micobactina, antifúngicos, antibióticos, y los prolongados periodos de tiempo requeridos para el aislamiento (8 a 12 semanas), la identificación bioquímica convencional resulta de escasa utilidad (Mckee y col., 1988, Marco y col. 1990).

Los medios de cultivo más empleados son el de Herrold y el Lowenstein-Jensen, con diversas modificaciones (Merkal y col., 1974, Fuentes, 1988c, Juste y col., 1989b). Además, se han obtenido buenos resultados con los de Nemoto, Stuart, Smith, Watson-Reid, Dorset-Henley, Agar Suero, Middlebrook (7H10) y Dubos (Wayne y col., 1986).

La adición de ciertos componentes como la yema de huevo o el ácido pirúvico, parecen estimular el crecimiento de M. paratuberculosis compensándose así el efecto depresivo producido por los antibióticos (Merkal y col., 1974, Jorgensen, 1982).

Sin embargo, Juste y col. (1989b) observan que este efecto estimulante con la adición de piruvato, solo se produce con cepas de origen bovino y no así con las de origen ovino, en las que incluso causaría en leve efecto contrario.

Fuentes (1988) añade a este respecto, que la adición de DNA a un medio con huevo, acelera el crecimiento de esta micobacteria.

Así, incluso la elección del medio idóneo dependería del origen de la cepa. Para aquellas de origen bovino debería emplearse el de Herrold con adición de piruvato sódico, y para las de origen ovino o caprino se obtendrían mejores resultados utilizando el medio de Lowenstein-Jensen sin la adición de piruvato (Juste y col., 1989b).

Las resiembras o la producción de grandes cantidades de cultivo se llevan a cabo en medio líquido. Se han utilizado diversos medios sintéticos como el propuesto por Merkal y col. (1982) o el Middlebrook 7H9. Los resultados son semejantes y el microorganismo crece superficialmente y en menos tiempo que en el caso del aislamiento primario (4 a 8 semanas).

A fin de evitar la proliferación de agentes contaminantes, en primer lugar hay que proceder a la decontaminación de la muestra, lo que a su vez deprime aún más el crecimiento de M.paratuberculosis. Se suelen emplear tres métodos: uno utilizando álcalis y posterior neutralización, otro, empleando ácidos y neutralización, y un último mediante el uso de detergentes (Jorgensen, 1982, Carter, 1984, Ratnamohan y col., 1986, Kim y col., 1988, Casal y col., 1990).

Dentro del primero se puede incluir el tratamiento con lauril sulfato sódico y sosa al 1%, neutralizando posteriormente con ácido fosfórico.

Para la decontaminación con ácidos se ha usado el sulfúrico (10%), y el oxálico (5%), neutralizando normalmente con hidróxido sódico y sembrando en un medio sintético o agar-suero.

Los detergentes son sin embargo el método más utilizado, debido sin duda a su fácil manejo, ya que no necesitan neutralización si se emplea un medio con yema de huevo cuyos fosfolípidos los neutralizan, además de por su propia eficacia. El más empleado en un principio fue el cloruro de benzalconio, si bien últimamente se destaca el cloruro de hexadecil piridinio, menos lesivo para las micobacterias según Jorgensen (1982) y Marco y col. (1987).

I.9.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este tipo de prueba se encuentra aún en estudio para la paratuberculosis. Parece ofrecer resultados muy esperanzadores, su sensibilidad y especificidad resultan semejantes a las del cultivo y además el diagnóstico requiere muy breve periodo de tiempo. Económicamente es costosa. En la actualidad se disponen de muy pocos datos de campo (Drake y col., 1987, Ellner y col., 1988, Vary y col., 1990, Giessen y col. 1992).

I.9.4. DETECCION DE LA INMUNIDAD DE BASE CELULAR.

En la paratuberculosis se desarrolla una respuesta de base celular variable, no solo desde el punto de vista individual, sino también desde el punto de vista del curso de la infección. Por tanto la eficacia de las pruebas encaminadas a la detección del grado de inmunidad celular ha de analizarse minuciosamente.

En general estas pruebas presentan una baja especificidad y el preparado proteico micobacteriano (tipo PPD tuberculoso) contiene antígenos comunes a otros miembros del orden actinomicetales (Actinomyces, Corynebacterium, Nocardia, etc..). Así, pueden aparecer no solo reacciones cruzadas, sino que con frecuencia se observa la presencia de falsos negativos debido a situaciones de tolerancia, anergia o factores que enmascaran los antígenos. Esto último es usual en estadios terminales de la enfermedad y puede que en otras fases durante el curso de las infecciones crónicas (Chiodini y col. 1984).

Entre las técnicas utilizadas destacaremos:

I.9.4.1. Reacción intradérmica

Se basa en fenómenos semejantes a lo que sucede en tuberculosis. Cuando se inoculan extractos proteicos de M. paratuberculosis (Johnina o paratuberculina) o de M. avium

(tuberculina aviar) se desarrolla una respuesta inflamatoria local que nos indicará un contacto previo con el agente/s. Este tipo de prueba se realiza intradérmicamente en la zona caudal del animal, administrando 0.1 ml de johnina.

En caso positivo se produce un aumento relativo superior a 3mm de espesor, medido en el pliegue de la piel de la zona inoculada hacia las 48 hpi. (Merkal y col. 1968). En ganado ovino según este último autor la respuesta a la johnina sólo se produce durante un periodo de 6 a 8 meses. Siempre según este mismo autor, la sensibilidad y especificidad de la prueba intradérmica se situaría en torno al 25%.

Este tipo de prueba tiene utilidad solo en el caso de los pequeños rumiantes, no en el ganado bovino por razones obvias con respecto a tuberculosis. Así mismo, solo resultará viable como prueba diagnóstica realizada en la colectividad, precisándose un mayor número de datos para establecer en realidad su sensibilidad y especificidad (Juste y col. 1990).

I.9.4.2. Pruebas "in vitro"

Teniendo en cuenta las limitaciones económicas en esta especie ovina, la pruebas "in vitro" para la evaluación de la inmunidad celular se han utilizado mayoritariamente en investigación.

El test de transformación linfoblástica, en el que los linfocitos en presencia de antígeno regresan adquiriendo gran actividad nuclear, o la prueba de inhibición de la migración leucocitaria, en el que tras incubación de las células en presencia de antígeno se agrupan, resultan poco realizables en la práctica. En el primer caso (prueba de la transformación) el método resulta poco específico pero muy sensible, mientras que en el segundo caso, la prueba es relativamente sencilla pero se desconoce su eficacia diagnóstica (Buergelt y col., 19878, Williams y col., 1985, Elsen y col., 1986).

I.9.5. DETECCION DE LA INMUNIDAD HUMORAL

La determinación de la presencia de anticuerpos específicos frente a M. paratuberculosis presenta evidentes ventajas con respecto a lo expuesto en el apartado anterior. Resulta fácil la obtención de muestras y es sencillo generalmente su proceso en el laboratorio. Sin embargo, el desarrollo de inmunidad humoral suele ser menos rápido que el de la celular, e incluso a veces es inexistente. Además también se puede observar la aparición de reacciones cruzadas en gran parte de las pruebas llevadas a cabo.

Han sido normalizados numerosos métodos de detección de anticuerpos frente a paratuberculosis con diverso grado de éxito (Abbas y col., 1983a, Yokomizo y col., 1983, Sherman y col., 1984, Pepin y col., 1987, Brooks y col., 1988, Koh y col., 1988, Garcia-Belenguer y col., 1989, Sugden y col., 1989, Juste y col., 1989a, Ridge y col., 1991, McNab y col., 1991b).

Entre los más empleados revisaremos:

I.9.5.1. Agar-Gel Inmuno Difusión (AGID).

Este método de detección es simple y rápido. Se lleva cabo sobre un soporte de agarosa perforado con pocillos para depositar las muestras. Se basa en la reacción acaecida, en caso positivo, entre el antígeno central y el/los suero/s problema/s, que se evidencia con la formación de líneas de precipitación hacia las 48-72 horas (Sherman y col. 1989).

Es una técnica eficaz y repetitiva en las especies ovina y caprina. Posee una máxima especificidad (100%) y una menos elevada sensibilidad (72%) (Juste y col. 1989a). Sin embargo, en el ganado bovino parece ofrecer peores resultados (Sherman y col., 1990, Shulaw y col., 1993).

En la actualidad sigue utilizándose con frecuencia, individualmente o como apoyo confirmatorio de otras técnicas. Se emplea en programas de control para la identificación y sacrificio de los animales enfermos (Merkal, 1989).

I.9.5.2. Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA).

Este método de fácil automatización, capaz de procesar un elevado número de muestras y generalmente de gran sensibilidad y especificidad, presenta algunas dificultades para el diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado ovino. En esta especie ofrece una moderada especificidad y además es poco repetitiva.

Se emplea en programas de saneamiento junto a otras técnicas, como el AGID, para el diagnóstico individual. A pesar de las desventajas antes mencionadas, resulta de utilidad en la prospección de colectividades (Ridge y col., 1991).

En este caso la detección de la presencia de anticuerpos se basa en el contacto del suero problema y un antígeno (generalmente purificado) fijado a la placa. El revelado se realiza con otro anticuerpo antiespecie marcado, quien a su vez reacciona con un sustrato provocando un cambio de color. Este, se cuantifica mediante un lector de densidad óptica (Sánchez y col., 1981).

Puede lograrse un aumento de la especificidad de la técnica para ovino, mediante el empleo de antígeno purificado y la adsorción previa de la muestra con otra micobacteria (Milner y col., 1989).

El empleo de diversos antígenos y/o un antígeno comercial protoplásmico de estas características, ha logrado una especificidad del 80% y una especificidad del 94% (Yokomizo y col., 1983, Juste y col., 1988, Sudgen y col., 1989).

Por otro lado, la adsorción de los sueros con M. phlei secuestra gran número de los anticuerpos de grupo, aumentando así mismo la especificidad de la reacción (Yokomizo y col., 1985, Milner y col., 1987).

I.9.5.3. Otras.

Fijación del Complemento. Este método clásico ha sido empleado durante un elevado número de años, con resultados muy aceptables en cuanto a sensibilidad. Posee desventajas como la escasa especificidad, la existencia de reacciones cruzadas, el poder anticomplementario demostrado en suero ovino o su baja repetitividad (Thoen y col., 1979, Pepin y col., 1987, Sherman y col., 1990).

Por otro lado y desde el punto de vista inmunitario, hay que tener en cuenta que los anticuerpos fijadores del complemento no se desarrollan durante el primer año tras la infección, y que desaparecen rápidamente al iniciarse la fase clínica de la enfermedad (Merkal, 1989).

El principio de esta técnica se basa en que la formación de complejos antígeno-anticuerpo problema, activa la fijación del complemento fijándolo y evitando su actuación sobre un segundo sistema Ag-Ac conocido empleado para revelar la reacción. Se han empleado distintas versiones del método. Su sensibilidad y especificidad medias se han podido evaluar en un 80% y un 50%, respectivamente (Juste y col. 1990a).

Por último, entre otras pruebas empleadas para el diagnóstico de la paratuberculosis hay que citar: la hemoaglutinación pasiva, la inmunolectroforesis y la inmunofluorescencia indirecta, todas ellas de escasa sensibilidad y especificidad y por tanto poco utilizadas (Thoen y col. 1988).

I.10.- TRATAMIENTO

Para el tratamiento etiológico se han ensayado, sin eficacia, diversos fármacos antituberculosos (hidracida del ácido isonicotínico, minociclina). Algunas terapéuticas empleando antibióticos convencionales (estreptomina, clofamicina, rifampicina) parecen disminuir los signos

clínicos del animal. Sin embargo, al cesar el tratamiento la enfermedad puede recaer con mayor intensidad. Ello, junto a otras consideraciones de orden sanitario, higiénico, económico y de control hacen que en la práctica no se emplee tratamiento alguno (Fuentes, 1988).

I.11.- CONTROL

El prolongado período de incubación de esta enfermedad, su naturaleza insidiosa y el bajo desarrollo de las lesiones hacen de esta enfermedad una de las más difícil reconocimiento y saneamiento (Worthington, 1964). Algunos de los objetivos básicos que ha de perseguir el control de la paratuberculosis, pueden concretarse en (Saez de Ocariz, 1987, Ordas y col., 1989, Merkal, 1989):

- * la detección de animales infectados en el rebaño y su eliminación
- * la aplicación de distintas medidas de tipo preventivo
- * evitar la importación de la enfermedad al rebaño y limitar la supervivencia de M. paratuberculosis.

La eliminación rápida de los animales enfermos no plantea excesivos problemas, ya que existen diferentes métodos diagnósticos directos de fácil aplicación. Sin embargo, el diagnóstico de animales portadores suele precisar métodos indirectos que habrá que perfeccionar (Juste y col., 1990).

Desde el punto de vista práctico, se deben de sacrificar todos los animales enfermos y sospechosos (a veces con la intensificación del desvieje sobre animales en mal estado y poco productivos puede ser suficiente), como primera medida de saneamiento (Tejedor, 1986).

Aquellos otros que presenten una serología positiva mediante AGID, también pueden ser eliminados, si es posible en términos económicos. Esta técnica asegura la eliminación

de un alto porcentaje de infectados en fase preclínica. Es mucho más económica y sencilla que el cultivo de heces, sin embargo, el problema es su baja sensibilidad con lo que probablemente no eliminemos todos los portadores, prolongándose la duración del programa (Scott-Ovr y col., 1988).

Otro de los problemas que puede plantear el diagnóstico indirecto es su no utilización sobre animales vacunados. Así, ha de recurrirse a otros métodos como el cultivo microbiológico. Este, ha de llevarse a cabo sobre un porcentaje significativo de los animales del rebaño para detectar la presencia de la infección. Cuando se obtienen resultados positivos ha de aplicarse a la totalidad del efectivo repetitivamente cada 6 meses, eliminando siempre a los positivos (Chiodini y col., 1984, Merkal, 1984).

Con respecto a las medidas de tipo preventivo, la más representativa es la vacunación. Esta, no previene la infección por lo que, además, hay que poner en práctica medidas que minimicen el contagio (Sigurdson, 1960, Wilesmith, 1982, Saxegaard y col., 1985).

Otras medidas de tipo preventivo radican en evitar factores de estrés y una buena alimentación, ello favorecerá la respuesta frente a la infección y disminuirá el porcentaje de animales que desarrollan la enfermedad. Parece demostrada la eficacia de una dieta equilibrada en minerales, vitaminas y con una relación Ca/P adecuada (Chiodini y col., 1984).

En ningún caso, se deben dejar para reposición corderos procedentes de reaccionantes positivos ni de animales enfermos, ya que el contacto con el agente es precoz (Wortington, 1964, Kimberling, 1988).

Cuando nos encontramos ante un efectivo donde está presente la infección, es recomendable que los recién nacidos se sometan a lactación artificial, proceder a l cebo en áreas exentas e incluirlos en el rebaño a partir del año de vida. A veces esto no es posible desde el punto de vista económico,

pero en los rebaños de producción láctea no es tan dificultoso (Gilmour y col. 1983).

En cuanto a la importación de la enfermedad al efectivo, una de las medidas más elementales deriva de evitar el contacto con animales de otros rebaños o eludir los pastos comunales. No tan sencillo resulta garantizar la reposición con animales procedentes de rebaños con garantía de encontrarse exentos (no sólo que no tengan casos clínicos). Cuando esto no es posible, hay que al menos tener la precaución de introducir animales mayores de dos años, previa cuarentena y serología negativa.

Aún para reforzar más las garantías con respecto a la introducción de la enfermedad, puede mantenerse a estos animales de reposición al menos cuatro meses apartados del resto del grupo y realizar controles microbiológicos de las heces al comienzo y fin del periodo de observación (Juste y col. 1990c). Otra estrategia consistiría en la consecución de "rebaños cerrados", pero plantea a medio, largo plazo otros inconvenientes (Chiodini y col., 1984).

Por otro lado, se ha observado que cuando el pastoreo se realiza en suelos alcalinos, la enfermedad clínica presenta menor intensidad que cuando se trata de animales que se alimentan sobre suelos ácidos o deficientes en minerales (Jorgensen, 1977, Kopecky, 1977). Así mismo parece que el tratamiento con ésteres de fósforo y el abonado de los pastos con fosfatos, reducirían el nivel de enfermedad clínica en el rebaño (Richards, 1988). Los pastos de zonas muy afectadas deben ser sometidos a laboreo y corrección en su caso (Delaune y col., 1966, Fouquet y col., 1979).

Las medidas higiénicas forman parte importante de las medidas de control, y no siempre por repetidas se llevan a cabo correctamente. Los apriscos y abrevaderos deben ser limpiados y desinfectados con productos adecuados (compuestos fenólicos o cresólicos, adicionados con detergentes). Las camas han de ser retiradas con frecuencia y si es posible instalar bebederos elevados con agua corriente (Thoen y col., 1988).

Todas estas medidas de control conllevan, a pesar de todo, un costo menor que el mantenimiento de un rebaño con enfermedad. Los programas sanitarios pueden concluir en un plazo de 5 a 10 años, en función del grado de infección, la diligencia del ganadero y el nivel económico del rebaño, con la eliminación de la enfermedad (Chiodini y col, 1984, Gilmour, 1988).

Por último, el control a nivel nacional o regional es difícil dada la ausencia de un único método de diagnóstico eficaz. Desde el punto de vista económico y siempre que el país emplee frente a esta enfermedad suficientes recursos financieros, sería posible realizar programas de amplia cobertura con emisión de certificaciones oficiales. Ello, podría llevarse a cabo mediante la identificación serológica de los rebaños indemnes a los que se certificaría como "negativos probados".

En caso de existir algún positivo, se sacrificaría y se procedería al muestreo microbiológico del rebaño durante tres periodos consecutivos de 6 meses. Estos certificados incluso podrían emitirse por parte de las agrupaciones de productores, pudiendo repartirse las cargas financieras entre ambos, administraciones y productores Chiodini y col. (1984).

Collins y col. (1991) consideran que, en ganado vacuno, un programa de diagnóstico y eliminación de afectados es rentable siempre que la prevalencia sea mayor del 6%, y las pruebas diagnósticas empleadas ofrezcan, al menos, una sensibilidad del 50% y una especificidad del 98%. El costo económico real supondría menos de 4 dólares americanos por bovino.

I.12.- VACUNACION

La primera vacuna frente a paratuberculosis data de 1926 (Vallée y Rinjard). Se han elaborado desde entonces diversos productos inmunizantes con diferentes grados de éxito (Sigurdson, 1960, Larsen y col., 1978, Merkal, 1984, Saxegaard y col., 1985).

En primer lugar, hemos de realizar las siguientes consideraciones con respecto a la inmunización. La administración de vacunas reduce en un rebaño la cifra de enfermos, el número de excretores y el de animales con infección intestinal detectable. Sin embargo, no confiere inmunidad total, ni evita que se pueda producir la infección.

El uso de vacunas protege, en la mayor parte de los casos, frente al desarrollo de la enfermedad clínica, o bien retrasa su aparición. A pesar de ello, los individuos vacunados pueden desarrollar todos los grados de la enfermedad e incluso pueden ser portadores. La vacunación tiene un efecto beneficioso a nivel colectivo (Chiodini y col., 1984, Adúriz y col., 1989).

Ejemplos de ello, son los estudios realizados por Fuentes en 1988, quien aisló M. paratuberculosis a partir de las heces del 2.14% de los ovinos vacunados o los realizados por Sherman y col. en 1989, quienes sobre 48 terneras vacunadas detectaron tres positivas mediante AGID y una mediante aislamiento.

Como efectos negativos de la vacunación podemos citar que los animales vacunados responden positivamente a las pruebas diagnósticas durante un periodo de tiempo prolongado. Así mismo presentarán reacción positiva mediante la prueba de la tuberculina/johnina. Este hecho, es importante ya que puede interferir en el saneamiento del ganado vacuno y caprino (Saez de Ocariz, 1987).

Otro efecto indeseable es la aparición de un nódulo fibro-caseoso en el punto de inoculación del producto inmunizante, de tamaño variable (a veces considerable), que perdura en el tiempo y puede fistulizar. Los animales jóvenes en los que aparece un mayor desarrollo del nódulo vacunal, pueden presentar retraso en el crecimiento y prolongación de la edad de cubrición (López, 1989).

Hasta ahora en España y en otros países europeos se ha utilizado vacuna viva atenuada. En EE.UU. se utiliza un producto inactivado con resultados semejantes, que genera menor riesgo epidemiológico (Merkal, 1989).

Todas las vacunas se administran antes de las 2-4 semanas de vida, en la región pectoral inferior, afin de que el nódulo generado no entorpezca la marcha y se favorezca el drenaje caso de fistulización. La aplicación en edades más avanzadas no parece producir efectos negativos, reduciéndose ligeramente la incidencia en el rebaño (Gilmour, 1965). Sin embargo, la mayor parte de los autores no aconsejarían la vacunación masiva del efectivo, ya que probablemente se asistiría a una reactivación del proceso en aquellos animales infectados. Por otro lado, tampoco sería recomendable la revacunación puesto que parece disminuir la resistencia (Larsen y col., 1978, Adúriz y col., 1989).

Los programas de vacunación han de llevarse a cabo sobre rebaños afectados no sobre aquellos exentos de paratuberculosis, dentro de un programa de control estricto tal y como hemos mencionado en el apartado anterior (Chiodini y col., 1984).

La inoculación accidental de la persona que aplica la vacuna puede originar un nódulo granulomatoso en este punto, que podría requerir tratamiento quirúrgico, aunque sin otras consideraciones desde el punto de vista sanitario (Juste y col., 1989c).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

II JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

A estas enfermedades no se les había prestado una excesiva atención hasta hace escasamente unas décadas. En los últimos años en nuestro país se están publicando datos acerca de la enfermedad de Johne, que parecen evidenciar la presencia de mayores tasas de prevalencia de lo que en principio cabría esperarse o sospecharse. Por tanto su importancia económica va en aumento, con especial incidencia sobre rebaños destinados a producción de leche.

El esclarecimiento de su distribución a nivel geográfico, las probabilidades de difusión dentro de un efectivo, o entre efectivos de un mismo área, su incidencia según el tipo de producción o según el tipo racial, la eficacia de la vacunación sistemática y la seguridad de los métodos diagnósticos son datos que se precisará conocer para instaurar una política eficaz de control. Esta información podrá plasmarse en planes para el saneamiento y control de estos problemas tanto a nivel de Comunidad Autónoma como a nivel Nacional, si fuese preciso y a medio plazo al menos.

El estudio epidemiológico que nos ocupa pretende contribuir a toda esa información general que evaluará la conveniencia de la aplicación de distintos procedimientos, que permitan disminuir la mortalidad y aumentar la resistencia inmunitaria de los animales. Este último aspecto es muy importante, ya que el desarrollo de la enfermedad clínica parece estar íntimamente relacionado con algunos factores de estrés y con la disminución de los niveles inmunitarios, asociados muchas veces a estados de tipo fisiológico (puerperio, lactación, déficit o desequilibrios alimentarios, etc..).

Por todo ello al iniciar este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar las tasas de incidencia clínica de la enfermedad en algunas de las comarcas de la provincia de Segovia.
- 2.- Relacionar estas tasas incidencia con los sistemas de manejo empleados en cada rebaño.
- 3.- Conocer las tasas reales de prevalencia de la infección en ambos tipos de población existentes en la zona estudiada.
- 4.- Comprobar la eficacia de los sistemas de control mediante la aplicación de un programa sanitario y de inmunización con vacuna viva atenuada.
- 5.- Evaluar las prevalencias obtenidas mediante distintos métodos serológicos de diagnóstico, y valorar su utilidad en programas de eliminación de positivos.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

III.1.1. REACTIVOS

ADN	DIFCO
Acido acético	MERCK
Acido bórico	MERCK
Acido cítrico monohidratado	MERCK
Acido clorhídrico	MERCK
Acido fluorhídrico	MERCK
Acido fosfórico	MERCK
AntiIg G oveja-peroxidasa	NORDIC
Azino di(3-ethylbenzthiaz. sulf.) (ABTS)	BOEHRINGER
Agar	OXOID
Agar noble	DIFCO
Agarosa	DIFCO
Alumbre potásico	PANREAC
Asparragina	DIFCO
Anfotericina B	GIBCO
Azul de metileno	PANREAC
Benzoato de metilo	MERCK
Broth Nutrient	DIFCO
Carbonato sódico	MERCK
Citrato sódico tribásico	MERCK
Cloroformo	PROBUS
Cloromicetina	BOIMERIEUX
Cloruro de benzalconio	MERCK
Cloruro férrico	MERCK
Cloruro potásico	MERCK
Cloruro sódico	PANREAC
Depex	CARLO ERBA
Eosina Y	PANREAC
Etanol absoluto	MERCK
Etanol 96°	PANREAC
Etanol 80°	PANREAC
Etanol 70°	PANREAC

Etanol 50°	PANREAC
Formalina 35-40%	PROBUS
Fosfato disódico anhidro	MERCK
Fosfato monosódico anhidro	MERCK
Fosfato monosódico monohidratado	MERCK
Fosfato potásico	MERCK
Fuchina básica	PANREAC
Gelatina	PANREAC
Glicerina	MERCK
Hematoxilina de carrazzi	MERCK
Hidrato de cloral	OXOID
Hidróxido sódico	PANREAC
Lauril sulfato sódico	MERCK
L-Cisteína	DIFCO
Lowenstein-Jensen, medio base	DIFCO
Metanol	MERCK
Micobactina J	RHÔNE-M
Middlebrook 7H9, medio base	DIFCO
Mycostatin	SIGMA
Nutrient broth	DIFCO
OADC	DIFCO
Parafina plastificada	PANREAC
Penicilina	FLOW
Peptona	OXOID
Peróxido de hidrógeno	PANREAC
Piruvato sódico	MERCK
PPA-3 (antígeno para AGID y ELISA)	ALLIED
Púrpura de bromocresol	CARLO ERBA
Rojo neutro	CARLO ERBA
Suero fetal bovino (SFB)	FLOW
Tween 20	MERCK
Tween 80	MERCK
Timol	PANREAC
Tolueno	PROBUS
Yodato sódico	MERCK
Xilol	PROBUS

III.1.2.- SOLUCIONES EMPLEADAS**Solución salina (s.s.)**

Cloruro sódico	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Formol tamponado pH 7 para Histología

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	4.00 g
Na_2HPO_4	6.50 g
Formalina al 10%	100 ml
Agua destilada	900 ml

Hematoxilina de carrazzi

Hematoxilina	0.50 g
Yodato potásico	0.10 g
Alumbre potásico	25.0 g
Glicerina	100 ml
Agua destilada	400 ml

Pulverizar la hematoxilina y el alumbre en mortero. Mezclar con glicerina y añadir agua. Homogeneizar y añadir tras 10 minutos el yodato. Dejar reposar 15 días en frasco ámbar.

Eosina

Eosina Y	1.0 g
Acido acético	1-2 gotas
Agua destilada	100 ml

Fucsina de Ziehl

Fucsina básica	0.3 g
Alcohol etílico	10 ml
Fenol (cristales licuados)	5.0 ml
Agua destilada	95 ml

Fucsina de Kinyoun

Fucsina básica	4.0 g
Fenol (cristales licuados)	8.0 ml
Etanol 96°	20 ml
Agua destilada	100 ml

Alcohol clorhídrico

Acido clorhídrico concentrado	3 ml
Etanol 96°	97 ml

Azul de metileno

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	1000 ml

Solución decontaminante para tejidos

L-Cisteína	0.5 g
Cloruro de Benzalconio	3.0 g
Agua destilada	97 ml

Solución decontaminante para heces

Cloruro de Benzalconio	3 g
Agua destilada	997 ml

Tampón fosfato salino (PBS) 0,067M pH 7

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	9.11 g
PO_4HNa_2	9.51 g
ClNa	3.95 g
Agua destilada	1.000 ml

Tampón fosfato salino (PBS) pH 7

ClNa	8.0 g
ClK	0.2 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.2 g
PO_4HNa_2	1.15 g
Agua destilada	1.000 ml

Solución decontaminante de Lauril Sulfato Sódico

Lauril Sulfato Sódico	30 g
$\text{Na}(\text{OH})$	10 g
Agua destilada	1.000 ml

Solución Neutralizante

Acido Fosfórico	1.5 ml
Púrpura de bromocresol (1:250)	2 ml
Agua destilada	1.000 ml

Solución de Tween-Peroxidasa (hidrólisis del tween)

Tween-80 (10%)	10 ml
Peróxido Hidrogeno (30%)	10 ml

Solución sustrato (hidrólisis del tween)

Tween-80	0.5 ml
R rojo Neutro (0,1 %)	2 ml
PBS 0.067 M pH 7	100 ml

Tampón borato para agar gel difusión (AGID)

Acido bórico	0.19 g
Cloruro potásico	0.72 g
Agua destilada	95.0 ml

Se ajustó a pH 8.3 y se completó el volumen hasta 100 ml. Se conservó a 4°C.

Agarosa-borato para AGID

Agar noble	1.0 g
Tampón borato	5.0 ml
Solución salina	95 ml
Azida sódica	0.1 g

Tampón carbonato para ELISA

Carbonato sódico	5.3 g
Agua destilada	1.000 ml

Ajustar a pH 9.6 con HCl 1N.

Solución de lavado para ELISA

Cloruro sódico	8.5 g
Tween-20	0.5 ml
Agua destilada	1.000 ml

**Tampón fosfato-Tween gelatina para dilución de sueros
(ELISA)**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.8 g
NaH_2PO_4	12.36 g
ClNa	8.5 g
Agua destilada	993 ml
Ajustar a pH 7.6 con NaOH 1N.	
Tween-20	0.5 ml
Esterilizar en autoclave.	
Gelatina	1 g

Tampón citrato 0.05 M para ELISA

Solución A:

Acido citrico	22.97 g
Agua destilada	1.000 ml

Solución B:

Citrato sódico tribásico $2\text{H}_2\text{O}$	29.41 g
Agua destilada	1.000 ml

Mezclar 660 ml de la solución A y 470 ml de la solución B. Completar a 2000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 4 con ClH 1N.

Sustrato para ELISA

Tampón citrato	50 ml
ABTS	5.48 μg
Agua oxigenada (1:25)	19 μl

Proteger iluminación.

Solución de frenado

Acido fluorhídrico (45%)	889.33 μl
Agua destilada	20 ml

III.2.- CEPAS EMPLEADAS.

Se han empleado distintas cepas de M. paratuberculosis de origen ovino aisladas y tipificadas por el Laboratorio regional de Sanidad Animal de Algete (Madrid), así como una cepa de referencia procedente de la NCTC (8578) (Reino Unido) de origen bovino.

Asimismo se utilizó una cepa de M. phlei procedente del Laboratorio regional antes mencionado, para la obtención de micobactina P y la adsorción de sueros analizados mediante enzimoimmunoensayo.

III.3.- MEDIOS DE CULTIVO.

Para el primoaislamiento y las resiembras se empleó el medio de Lowenstein-Jensen con algunas modificaciones. La primera siguiendo un método descrito por Fuentes (1988) y la segunda siguiendo un método descrito por Juste (1989)

III.3.1.- Medio Lowenstein Jensen modificado (Fuentes, 1988):

Agua destilada	1.000 ml
Medio Base	65 g
Glicerina	30 ml
Agar	30 g
Micobactina P o J	2 mg

Ajustar a pH 7. Esterilizar en autoclave.

Adicionar a 55 °C:

Penicilina	200.000 UI.
Cloranfenicol	0.5 g
Mycostatina	30 mg
Piruvato Sódico	5 g

Yemas de huevo fresco	6
ADN	0.80 mg

Se repartió estérilmente 8 ml en tubos de vidrio con tapón de rosca. Solidificar en inclinación. Conservar a 4° C.

III.3.2. Medio Lowenstein Jensen modificado (Juste, 1989):

Glicerina	15 ml
Medio base	46.5 g
Micobactina J	4 mg
Agua destilada	750 ml

Ajustar pH a 7.1. Esterilizar en autoclave.

Adicionar a 55 °C:

Huevo entero	1.250 ml
Anfotericina B	100 mg
Penicilina	200.000 UI.
Cloranfenicol	200 mg

Se dispensaron 8 ml en tubos de vidrio con tapón de rosca. Los tubos inclinados, se sometieron a calor seco (90° C) durante 45-60 minutos hasta la coagulación del medio. Posteriormente, se mantuvieron a 37 °C durante 18 horas con el tapón flojo para facilitar la desecación. Se conservaron a 4° C.

III.3.3. Medio de Lowenstein Jensen sin micobactina

Se siguió idéntico método (a excepción de la adición de micobactina) para la elaboración del medio de control "sin micobactina".

III.3.4. Medio líquido para cultivo de M. phlei.

Para el cultivo de M. phlei se empleó un medio líquido de crecimiento. Se utilizaron frascos Roux o matraces a fin de producir grandes cantidades de cultivo. El medio se elaboró según se detalla a continuación:

Medio Base (Broth Nutrient)	15 g
Peptona	45 g
Agua destilada	1000 ml
Glicerina	100 ml

Se esterilizó en autoclave.

III.3.5. Obtención de Micobactina .

La micobactina fue extraída a partir de cultivos de 2-3 semanas de M. phlei. Se obtuvieron dos tipos de micobactinas:

Micobactina bruta: se obtuvo por filtración de los cultivos sobre papel Whatman. El material depositado sobre el filtro se recolectó y pesó, para después adicionar 100 ml de glicerina por cada 25 g de peso húmedo. Se esterilizó en autoclave durante 3 horas. La micobactina bruta así obtenida se empleó como aditivo para el medio de Lowenstein Jensen (65 ml por 1000 ml).

Micobactina purificada (P), se siguió la técnica propuesta por Merkal (1982): la masa celular se obtuvo de modo semejante a lo anteriormente citado. Cada 100 g de peso húmedo se suspendió en 280 ml de etanol 96%. Se mantuvo en agitación durante 48 horas a 4°C. Posteriormente, se procedió a filtrar sobre papel Whatman, conservándose el extracto alcohólico. Se añadieron 9 ml de una solución saturada de cloruro férrico en etanol de 70%. Por cada volumen de extracto se añadieron uno de agua destilada y otro de cloroformo. Se homogeneizó y se procedió a la extracción del cloroformo utilizando un embudo separador (parte inferior clara). Se evaporó en vacío a 60°C. Por último, la

micobactina se obtuvo diluyendo el residuo en metanol: 2 mg/ml. Se conservó a 4° C en frasco estéril.

III.3.6. Medio líquido Middlebrook 7H9

Este medio se utilizó fundamentalmente para llevar a cabo las pruebas bioquímicas de M. paratuberculosis. Para el cultivo (resiembra) de cada cepa se utilizaron frascos de plástico para cultivos celulares de 25 cm² de superficie. El método de elaboración fue el siguiente:

Glicerina	5 ml
Medio Base 7H9	4.7 g
Agua destilada	900 ml

El medio se calentó hasta ebullición para asegurar una disolución completa. Se esterilizó en autoclave A 50 °C se añadió para el enriquecimiento:

100 ml de OADC (oleico-albúmina-dextrosa-catalasa), integrado por:

Seroalbúmina bovina (fracción V)	50 g
Solución salina	900 ml
Oleato sódico	30 ml
Glucosa (50%)	40 ml
Catalasa	0.02 ml

Además se adicionó:

Micobactina J	2 mg
Asparragina	14 g

III.4.- MUESTRAS DE CAMPO. DISEÑO.

La recolección de muestras de campo se ha ordenado de forma cronológica, ajustándose al siguiente esquema:

- * 1988 se estudiaron 10 rebaños para establecer la incidencia de la enfermedad.

- * 1989 y 1990 se seleccionaron dos rebaños en los que se aplicó un programa de vacunación; se realizó en ellos un seguimiento semejante al del apartado anterior. Además, se prosiguió estudiando la incidencia en uno de los diez rebaños analizados durante 1988, en el cual no apareció ningún caso clínico en ese año.

- * 1990 y 1991 se llevó a cabo una toma de muestras sistemática en matadero. Durante 1990 se obtuvieron muestras de heces y tejidos para evaluar la prevalencia. A lo largo de 1991 se recolectaron sueros a fin de establecer la prevalencia serológica.

III.4.1. Rebaños estudiados durante 1988.

Los diez rebaños estudiados se ubicaron en la zona Centro-Norte de la provincia de Segovia. El seguimiento de los mismos se llevó a cabo a lo largo del año natural de 1988. Estos rebaños fueron seleccionados en base a distintos criterios: la posibilidad de un muestreo y seguimiento continuados, los distintos tipos de producción y por el hecho de estar incluidos en nuestra zona habitual de trabajo.

La denominación de cada rebaño estudiado, su tipo de producción, censo y número de muestras recolectadas (animal individual) se reflejan en la tabla nº 2.

Según el tipo de producción y de manejo los rebaños se clasificaron en dos grupos diferentes:

Grupo A: comprendió rebaños de raza churra o sus cruces con awassi, de aptitud láctea, con alimentación y manejo intensivo-semiintensivo. La mayor parte de ellos se ubicaron en la comarca de Cuéllar a excepción del rebaño Fuentepelayo III.

Grupo B: estuvo integrado por rebaños de razas castellana, manchega, sus cruces y los cruces con merina, de aptitud cárnica o mixta, con alimentación y manejo semiextensivo. En líneas generales, poseyeron un mayor número de efectivos que los anteriores y estuvieron ubicados en la comarca de Carbonero.

Tabla nº 2

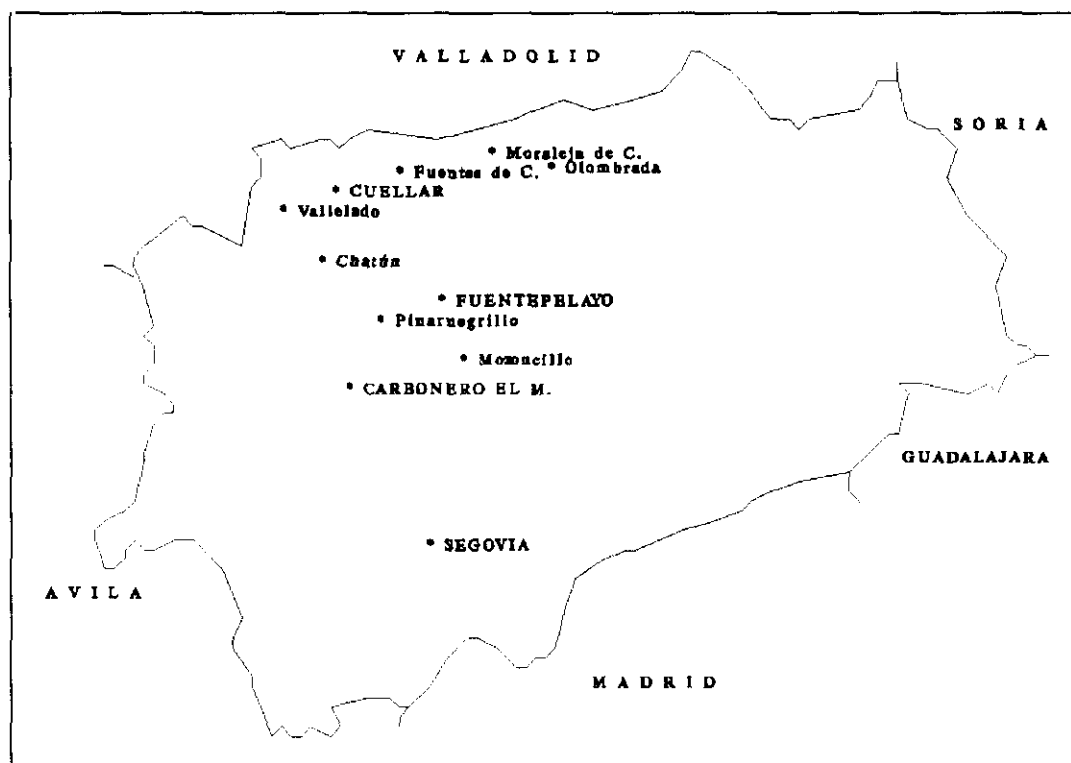
REBAÑOS ESTUDIADOS Y MUESTRAS OBTENIDAS

DENOMINACION REBAÑO PTB	PRODUCCION DESTINO	CENSO	Nº MUESTRAS
Fuentepelayo I	B	200	21
Fuentepelayo II	B	500	20
Fuentepelayo III	A	400	24
Chatún	A	450	32
Moraleja	A	250	10
Olombrada	A	200	12
Mozoncillo	B	400	0
Vallelado	A	150	12
Fuentes	A	250	14
Pinarnegrillo	B	350	12
TOTAL	A + B	3.100	157

La toma de muestras se llevó a cabo sólo a partir de aquellos animales vivos que evidenciaron signos clínicos de adelgazamiento. Los ovinos adultos que mostraban síntomas de enfermedad fueron sacrificados empleando Pentobarbital sódico a dosis elevadas por vía endovenosa. Estos sacrificios se realizaron para confirmar el diagnóstico, contabilizar las bajas objetivadas del rebaño y establecer la incidencia. El número total de ovejas analizadas fue de 157.

GRAFICO I

LOCALIZACION DE LOS REBAÑOS ESTUDIADOS Y MATADEROS



Sistemáticamente se realizó un diagnóstico diferencial para descartar la presencia de otras enfermedades caquetizantes como la Linfadenitis caseosa (pulmonar o ganglionar), o diversas enfermedades parasitarias (**facciolosis, dicroceliosis, hidatidosis, cisticercosis, sarcosporidiosis**). La observación de lesiones se centró en: la cavidad abdominal, los ganglios mesentéricos (tamaño relativo, arquitectura, edema y congestión), el aspecto de la serosa intestinal (inyección de vasos linfáticos), y por último se evaluaba el grado de engrosamiento de la mucosa intestinal.

Se obtuvieron las siguientes muestras:

- * heces
- * suero
- * fragmento de intestino correspondiente a la zona ileocecal.
- * ganglio linfático adyacente.

III.4.2. Muestras obtenidas a partir de dos rebaños seleccionados en los que se aplicó un programa de vacunación durante los años 1989 y 1990.

Se seleccionaron dos de los diez rebaños analizados siguiendo dos criterios básicos: de un lado elevada incidencia clínica de Paratuberculosis y de otro, el distinto tipo de producción de cada uno de ellos (carne y leche). El programa de vacunación por tanto, sólo se llevó a cabo en los rebaños "Chatún" y "Fuentepelayo I" y se acompañó de diversas medidas de higiene de las instalaciones, la eliminación de afectados, la administración de complejos vitamínico-minerales a libre disposición con la relación Ca/P invertida. Por otro lado, en el rebaño "Chatún" se comenzó a aplicar un programa de lactancia artificial.

La vacuna empleada fue suministrada por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León. Esta vacuna oficial es atenuada y va incorporada en excipiente oleoso (Lio-Johne, Ovejero o Neoparasec, Rhône Mérieux). Fue administrada a las corderas de reposición entre los 8 y los 21 días de vida, por vía subcutánea en la parte antero-ventral de la región pectoral. La inoculación en esta zona corporal se realizó para facilitar la supuración en caso de formación de absceso local y fistulización y así como para que el nódulo no interfiriese en la marcha.

El programa de vacunación y las medidas de tipo higiénico aplicadas a los dos rebaños, así como su seguimiento durante los años naturales de 1989 y 1990, tuvo como finalidad primordial estudiar el comportamiento de la enfermedad y la posible disminución de la incidencia clínica de los casos de Paratuberculosis.

De modo semejante a lo que se describe en el apartado anterior, se llevó a cabo una toma de muestras a partir de aquellos animales vivos que evidenciaron signos clínicos de adelgazamiento. Estos fueron sacrificados a fin de realizar el diagnóstico, contabilizar las bajas objetivadas del rebaño y establecer la incidencia.

Se obtuvieron las siguientes muestras:

- * heces
- * fragmento de intestino correspondiente a la zona ileocecal.
- * ganglio linfático adyacente.

III.4.3. Muestreo aleatorio en un rebaño sin sintomatología de la enfermedad.

Así mismo, durante el año 1989 se procedió a realizar una toma de muestras de heces al azar en un porcentaje del 5% en el rebaño de Mozoncillo. La prospección de este rebaño se prosiguió, debido a que no había existido sintomatología clínica entre los efectivos a lo largo del año 1988, año en

el que se realizó el primer seguimiento para establecer la incidencia de Paratuberculosis en la zona geográfica estudiada, la finalidad era comprobar si realmente se trataba de un rebaño exento.

III.4.4. Muestras obtenidas en matadero durante los años 1990 y 1991.

La zona geográfica de influencia de los mataderos estudiados se corresponde con la anteriormente mencionada para los rebaños.

La toma de muestras se llevó a cabo en las instalaciones para el sacrificio animal de los municipios de: Cuéllar (centro comarcal) donde predominan los rebaños de producción lechera de raza churra y sus cruces y los de Carbonero el Mayor y Fuentepelayo donde se sacrifica preferentemente ovino de producción cárnica o mixta de las razas castellana, manchega y sus cruces.

El muestreo se realizó semanalmente durante un período de tiempo comprendido entre Julio de 1990 a Junio de 1991. Se estudiaron todos los adultos sacrificados el día concreto de la recolección de muestras, siendo este por tanto un número variable que osciló entre 1 y 5 animales. Se analizaron un total de 104 individuos.

Se obtuvieron las siguientes muestras a partir de cada animal adulto:

- * fragmento intestinal de la zona ileocecal
- * heces

Por otro lado, se llevó a cabo una recolección de sueros en matadero con el fin de establecer la prevalencia de la enfermedad. Se analizó un 10% de los ovinos adultos sacrificados y un 5% de los de corderos mayores de 3 meses (pascuales). Se obtuvieron un total de 286 muestras serológicas que correspondieron 61 a animales adultos y 225 a corderos.

III.4.5. Obtención de sueros.

Las muestras de sangre se recolectaron en matadero en tubos de cristal de boca ancha y en el momento del sacrificio mediante sección de los vasos yugular y carótida. Se obtuvieron unos 50 ml por animal. Las muestras se transportaron al laboratorio después de cada sesión, conservándose a 4°C una vez iniciada la formación del coágulo. Los sueros se repartieron en alicuotas de unos 4 ml, conservándose a -20°C.

III.5.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

III.5.1. Muestras de tejidos para tinción.

Las muestras de tejidos obtenidas (intestino y ganglios linfáticos) se seccionaron para realizar improntas, en fresco, sobre portaobjetos. La fijación se llevó a cabo mediante calor y posteriormente se procedió a una tinción histológica empleando el método de Ziehl-Neelsen.

III.5.1.1. Método de Ziehl-Neelsen:

Los portaobjetos con la muestra fijada fueron recubiertos con papel de filtro a fin de evitar el depósito de colorantes, se añadió:

- * Fuchina de Ziehl en cantidad suficiente para cubrir la preparación. Se procedió a calentar hasta desprendimiento de vapores. Se dejó actuar 5 minutos.
- * Decoloración empleando alcohol-clorhídrico.
- * Contrastación utilizando azul de metileno durante 1.5 a 2 minutos.

En ocasiones se empleó una variedad de la técnica empleando fuchina de Kinyoun. En estos casos, se suprimió la aplicación de calor y se aumentó el tiempo de tinción en 1 minuto.

III.5.1.2. Histopatología.

Para la fijación se empleó una solución de formol tamponada. Las muestras de intestino no excedieron en tamaño más de 1.5 cm de ancho a fin de facilitar la penetración del fijador. Se mantuvieron sumergidas en el mismo al menos 24 horas. Las muestras se incluyeron en parafina plastificada (punto de fusión 56-58°C) utilizando un procesador Procemyr 1000. Las piezas de inclusión se tallaron introducidas en "cassettes" identificadas, para de nuevo someterse a fijación durante 12 a 24 horas.

La técnica de inclusión empleada fue:

Alcohol etílico 50%	2 horas
Alcohol etílico 70%	2 horas
Alcohol etílico 80%	1 hora
Alcohol etílico 96%	2 horas
Alcohol etílico 100% I	30 minutos
Alcohol etílico 100% II	1 hora
Benzoato de metilo	30 minutos
Tolueno I	30 minutos
Tolueno II	30 minutos
Parafina I	1 hora
Parafina II	2 horas
Parafina III	2 horas

La preparación de los bloques de parafina se llevó a cabo mediante una consola dispensadora (térmica y crioconsola) Tissue Tek.

Para la obtención de cortes seriados se empleó un microtomo Minot Leitz 1516. El grosor de las secciones obtenidas fue de 4 a 6 μm .

Como técnica rutinaria para el diagnóstico histopatológico se utilizó la tinción con hematoxilina-eosina. Se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- 1.- Desparafinar en xilol, durante dos ciclos de 10 minutos
- 2.- Hidratación en:

etanol absoluto	5 minutos
etanol 96% C	5 minutos
etanol 70% C	5 minutos
- 3.- Lavar en agua corriente 10 minutos
- 4.- Teñir con hematoxilina de carrazi 10 minutos
- 5.- Lavar en agua corriente 10-20 minutos
- 6.- Contrastar con eosina Y 0.5-1 minutos
- 7.- Lavar en agua
- 8.- Deshidratar en etanol de 96% y 100% 5 y 5 minutos
- 9.- Montaje de las secciones histológicas con Depex

III.5.2. Tratamiento de las muestras de tejidos para cultivo microbiológico.

Hasta que fueron procesadas las muestras de tejidos se conservaron en congelación a -20°C.

Para la obtención de mucosa y contenido intestinal se procedió al raspado de la zona íleo-cecal. Previamente, las muestras de ganglio se fragmentaron y homogeneizaron. Ambos tipos de muestras fueron sometidas a maceración empleando trituradores de Ten Broeck y la adición de una cantidad suficiente de solución decontaminante para obtener una suspensión semilíquida de tejidos. El macerado así obtenido se sometió a decontaminación.

III.5.3. Tratamiento de las muestras de heces para cultivo microbiológico.

Estas muestras se mantuvieron en refrigeración a corto plazo. Cuando se precisó un mayor tiempo de almacenamiento se conservaron a -20°C.

Las heces se homogeneizaron empleando un pequeño volumen de agua destilada. Cada muestra se diluyó 1:40 p/v en agua destilada manteniéndose en agitación durante 30 minutos. La suspensión se dejó en reposo durante 30 minutos para después retirar aproximadamente 5 ml del sobrenadante. Este, fue sometido a decontaminación.

III.6.- METODOS DE DECONTAMINACION DE MUESTRAS.

A fin de contrastar los diversos métodos de decontaminación de muestras para el aislamiento de Micobacterias, se realizó una prueba previa empleando un total de 9 muestras. Algunos de los métodos recomendados para la decontaminación, se encuentran basados en el empleo de ácidos, álcalis, y detergentes catiónicos. En nuestro estudio se utilizaron dos tratamientos, uno empleando cloruro de benzalconio y otro empleando lauril sulfato sódico.

III.6.1. Decontaminación con lauril sulfato sódico.

Para la decontaminación con este agente se utilizó una proporción 1:3 de muestra (previamente procesada como se describe en el apartado 3.5.2) y solución de lauril sulfato, respectivamente. La mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, para después neutralizar el sedimento con una solución de ácido fosfórico gota a gota hasta que se produjo un cambio de color. Se centrifugó de nuevo durante 15 minutos. Por último, el sedimento se sometió a cultivo microbiológico.

III.6.2. Decontaminación con cloruro de benzalconio.

Muestras de tejidos: una vez obtenido el macerado, según se describe en el apartado 3.5.2, se procedió a su decontaminación adicionando solución decontaminante v/v durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante

y el sedimento se resuspendió en un pequeño volumen de PBS estéril para después proceder al cultivo microbiológico.

Muestras de heces: este tipo de muestra se procesó según se describe en el apartado 3.5.3. Posteriormente, se añadió a la muestra la solución decontaminante en proporción 1:4 v/v, respectivamente. Se mezcló y mantuvo en reposo durante 18 a 24 horas. El sedimento obtenido se empleó para el cultivo microbiológico.

III.7.- CONDICIONES Y METODOS DE CULTIVO.

III.7.1. Prueba previa utilizando dos tipos de soportes:

Con un pequeño número de muestras se realizó un cultivo pareado en los mismos medios, pero en dos soportes distintos, por un lado tubos de cristal de 10 ml con tapón de rosca, y por otro tubos de policarbonato de un solo uso también con tapón de rosca, en total fueron sembrados 36 tubos de cada material.

III.7.2. Técnica de cultivo.

Una vez decontaminadas las muestras de tejido o heces, se procedió al cultivo empleando medio de Lowenstein-Jensen modificado con o sin adición de micobactina. Las muestras se cultivaron por triplicado (medio con micobactina), dejando un control sembrado en medio sin micobactina.

Se depositó 0.1 ml de inóculo por tubo. Estos, se mantuvieron a 37°C en posición horizontal y con tapón flojo durante la primera semana a fin de evaporar el agua en exceso. Pasado este período se procedió al cierre hermético de los tubos para evitar la desecación, situándose en posición vertical.

Los cultivos se revisaron con un intervalo de 7 días durante un periodo máximo de 16 semanas. Entre la 2ª y 4ª semanas se desecharon todos los cultivos contaminados. Para la identificación morfológica y confirmación del crecimiento se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen.

Siempre que fue posible y a fin de conservar la cepa, se realizó una resiembra a partir de los tubos de cultivo con crecimiento positivo. Se empleó un medio semejante al utilizado para el primoaislamiento pero sin la adición de antibióticos.

III.8.- PRUEBAS BIOQUIMICAS.

El crecimiento micobactina-dependiente, el periodo de tiempo del cultivo y la característica de ácido-alcohol resistencia constituyen los primeros pasos de elección para la tipificación de M.paratuberculosis. Sin embargo, es preciso además realizar diversas pruebas bioquímicas para completar esta identificación. En nuestro estudio se realizaron las pruebas de: la niacina, la catalasa en caliente y la hidrólisis del tween 80.

III.8.1. Prueba de la niacina.

Se trata de una prueba clásica aplicada de forma rutinaria para el diagnóstico entre los microorganismos del género *Mycobacterium*. Esta reacción se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para producir ácido nicotínico, el cual reaccionará con el bromuro de cianógeno generándose una sustancia que, a su vez unida a una amina aromática (anilina) formará un compuesto final que se colorea de amarillo. Permite diferenciar la presencia de M. tuberculosis ya que sólo este agente presenta reacción positiva. Sin embargo, algunos autores han obtenido resultados variables con M. paratuberculosis (Chiodini, 1984, Manrique, 1988).

Para llevar a cabo esta prueba es necesario emplear cultivos crecidos en medio liquido 7H9 adicionado con asparragina. Se depositaron 0.5 ml del medio crecido en tubo de cristal, se añadieron 0.5 ml de anilina al 4 % y 0.5 ml de bromuro de cianógeno al 10%. En caso positivo deberá virar a amarillo, en caso negativo se conservará el color azul oscuro.

III.8.2. Prueba de la catalasa a 68° C.

Esta prueba se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para descomponer el peróxido de hidrógeno, liberándose oxígeno molecular gaseoso en forma de burbujas y espuma.

Para llevar a cabo la prueba se empleó una suspensión de varias colonias en 0.5 ml de PBS 0.067M pH 7. Se sometió a una temperatura de 68° C en baño durante 20 minutos. La suspensión se dejó atemperar, para añadir posteriormente 0.5 ml de una solución Tween-Peroxidasa. La rápida ebullición de gas indicó un resultado positivo.

III.8.3. Prueba de la hidrólisis del Tween-80.

Esta hidrólisis se basa en la capacidad enzimática de algunas micobacterias para liberar cierta cantidad de ácido oleico esterificado contenido en el tween 80.

Para esta prueba se utilizaron tubos con 7 ml de medio sustrato base tween. Se sembraron varias colonias a partir de cultivos sólidos crecidos. Los medios inoculados se mantuvieron a 37° C durante 12 días, realizándose una observación diaria. En caso positivo, el color inicial rosa pálido viró a rojo.

III.9.- PRUEBAS SEROLOGICAS

III.9.1. Agar gel inmuno difusión (AGID).

Se procedió a preparar un gel de agarosa-borato de unos 2.5 mm de espesor. Se conservó a 4° C en cámara húmeda. La distribución de los pocillos fue en roseta y estos tuvieron un diámetro de 5 mm.

En el pocillo central se depositaron 50 μ l de antígeno (PPA-3, Allied) a una concentración de 4 μ g/ml. Los sueros control positivo se depositaron en dos pocillos periféricos, uno superior y otro inferior. Los sueros problema se depositaron en los cuatro restantes. Se incubó en cámara húmeda a 20° C. La lectura se realizó a las 24 y a las 48 horas.

La aparición de una banda de precipitación frente al pocillo central indicó un resultado positivo. Esta banda ha de continuarse con la correspondiente al pocillo de suero control. Se considera un resultado inespecífico cuando se visualizan bandas de precipitación sin continuación con la del suero control. En ocasiones, se apreciaron "bandas externas" o "internas" que algunos autores relacionan con la presencia de anticuerpos de origen vacunal (Juste, 1989a).

III.9.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

III.9.2.1. Adsorción del antígeno

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos. El tapizado de las placas se llevó cabo empleando 110 μ l/pocillo de antígeno (0.04 μ g/ml) (PPA-3, Allied) en tampón carbonato pH 9.6. Se mantuvieron en adsorción durante 18 h a 4 °C. Para la conservación a -20° C, las placas se lavaron tres veces con 220 μ l/pocillo de solución de lavado.

III.9.2.2. Tratamiento de los sueros

Todos los sueros problema y los controles fueron sometidos a un tratamiento previo v/v de adsorción con M. phlei (5 μ g/ml s.s.). Este tratamiento se utilizó a fin de disminuir la reacción inespecífica de los sueros. La mezcla se mantuvo en agitación suave durante 18 h a 4 °C. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se empleó como muestra de suero a dilución 1:2. La dilución de trabajo fue 1:100 en tampón de dilución de sueros.

III.9.2.3. Método

Una vez tapizadas las placas y adsorbidos los sueros se depositaron 100 μ l/pocillo de la correspondiente dilución de suero. En los pocillos A1 y A2 se añadió suero control positivo y en los B1 y B2 suero control negativo.

Se incubó 2 horas en cámara húmeda a 20° C, para después lavar 3 veces con solución de lavado. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de un conjugado antiIg G (H+L) oveja producido en conejo y marcado con peroxidasa (NORDIC), previamente titulado y diluido 1:4500 en tampón de dilución de sueros.

Se incubó de nuevo 2 horas a 20° C en cámara húmeda. Se lavó de nuevo 3 veces para posteriormente adicionar 100 μ l/pocillo del sustrato (ABTS). Se incubó en agitación durante 15-20 minutos y en ausencia de luz. La reacción se frenó empleando 50 μ l/pocillo de solución de frenado.

La lectura se realizó a 405 nm en un lector ELISA (EIA-R400, Invesgen).

III.9.2.4. Interpretación de los resultados.

A partir de todas las muestras de suero se obtienen dos

valores de absorbancia. Estos valores se evalúan en relación a la media aritmética de la densidad óptica resultante de los sueros controles positivos. El resultado de cada suero, por tanto, será doble empleando como referencia de positividad, en un caso el valor medio de los pocillos de los sueros controles cuando exceda del 90 % de densidad óptica, y en otro caso, cuando supere el 100%.

III.10.- METODOS ESTADISTICOS.

Se emplearon los programas Episcopa y Harvard Graphics. El primero de ellos se utilizó para realizar los cálculos correspondientes a la evaluación de las técnicas utilizadas y el grado de acuerdo entre las mismas. Este sistema fue desarrollado por Frankena, K. y Goelema, J.O. (Dpto. de Producción Animal de Wageningen, Holanda).

III.10.1.- Evaluación de las técnicas de diagnóstico. Sensibilidad y especificidad

Cuando se desarrolla o pone a punto una técnica de diagnóstico es necesario analizar su **validez** o capacidad para distinguir entre animales enfermos y no enfermos. La validez se expresa mediante la sensibilidad y la especificidad. Para la evaluación de este parámetro debe disponerse de un segundo método diagnóstico con una validez del 100% aproximadamente. Se emplea para ello una tabla de contingencia 2x2, a partir de la cual pueden calcularse otros parámetros como:

* Valor predictivo de un resultado positivo ó negativo, ej: el porcentaje de animales positivos/negativos que realmente son positivos/negativos.

* Prevalencia aparente, ej: El número de animales positivos dividido entre el número total de animales analizados.

RESULTADOS	ESTADO DE SALUD		
	ENFERMOS	NO ENFERMOS	TOTAL
POSITIVOS	A	B	A + B
NEGATIVOS	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N

A = número de verdaderos positivos

B = número de falsos positivos

C = número de falsos negativos

D = número de verdaderos negativos

$$* \text{ Sensibilidad (\%)} = 100 \times A / (A+C)$$

$$* \text{ Especificidad (\%)} = 100 \times D / (B+D)$$

Así, la **sensibilidad** es la capacidad de la técnica para detectar animales enfermos, y se define como la proporción de animales enfermos que resultaron positivos a la prueba.

La **especificidad** es la capacidad de la técnica para detectar animales no enfermos, y se define como la proporción de animales no enfermos que resultaron negativos a la prueba.

$$* \text{ Valor predictivo (val. posit., \%)} = 100 \times A / (A+B)$$

$$* \text{ Valor predictivo (val. negat., \%)} = 100 \times D / (D+C)$$

$$* \text{ Verdadera prevalencia (\%)} = 100 \times (A+C) / N$$

$$* \text{ Prevalencia aparente (\%)} = 100 \times (A+B) / N$$

Otro parámetro que puede calcularse es la eficacia de la prueba, que resulta del cociente entre:

$$* \text{ eficiencia} = (A+D) / (A+B+C+D)$$

III.10.2. Grado de acuerdo entre las técnicas empleadas

Cuando se utilizan diferentes métodos para el diagnóstico de una enfermedad, resulta interesante conocer el **grado de acuerdo** entre los mismos.

Es conveniente valorar el grado de concordancia existente entre una técnica de referencia y el método objeto de estudio. Ello puede llevarse acabo a partir de los datos obtenidos mediante las dos técnicas sobre una misma muestra de población. El grado de acuerdo entre ambas pruebas diagnósticas se expresa con el valor de kappa (k). Este valor expresa el grado de acuerdo más allá del azar.

Un k igual a 0 indica la no existencia de acuerdo entre las técnicas, mientras que un k igual a 1 expresa un perfecto acuerdo entre ellas. Hay que tener en cuenta que k indica cual es el método que da mejor resultado en cuanto al número correcto de animales enfermos o sanos. Este valor puede obtenerse mediante un tabla de contingencia 2x2:

TECNICA ESTUDIADA	TECNICA DE REFERENCIA		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	A	B	A + B
NEGATIVOS	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N

$A + D$ = número de resultados que coinciden

$B + C$ = número de resultados que no coinciden

La proporción esperada de resultados que coinciden (PE) es: $PE = (A+B)/N \times (A+C)/N + (C+D)/N \times (B+D)/N$

La proporción máxima de acuerdo no debida al azar es $1 - PE$. La proporción observada de resultados que coinciden más allá del azar es: $(A+D)/N - PE$

El valor kappa se define como: $(A+D)/(N-PE) / (1-PE)$

En palabras, **k** es el cociente entre la proporción observada de acuerdo más allá del azar y la máxima proporción de acuerdo más allá del azar. Un **k** de 0'5 indica un moderado nivel de acuerdo entre las técnicas.

IV. RESULTADOS

IV.RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS REBAÑOS ESTUDIADOS DURANTE 1988

IV.1.1.- Resultados de las muestras de tejidos sometidas a tinción. Puesta en evidencia del agente mediante métodos directos.

Utilizando el método de tinción de Ziehl-Neelsen pudo apreciarse la presencia de gérmenes con morfología y características semejantes a las descritas para las micobacterias (Merchant y col. 1975; Merkal, 1984; Chiodini y col. 1984; Juste, 1984; Wayne y col. 1986; Marco, 1987.).

La bacterioscopia directa realizada a partir de raspados de mucosa intestinal en la zona ileo-cecal se utilizó rutinariamente para el diagnóstico de animales enfermos. En los casos positivos se observó la presencia de grupos de bacterias ácido alcohol resistentes de un tamaño que osciló entre 1 y 2 μm . En función del número de microorganismos visualizados por campo microscópico se clasificaron las muestras en tres categorías: + positivo débil, ++ positivo y +++ fuertemente positivo. Esta última categoría estuvo siempre correlacionada con la presentación clínica de la enfermedad (figs. n°1, 2 y 3).

IV.1.2.-Histopatología.

La lesión básica en Paratuberculosis es una reacción inflamatoria de tipo crónico, productiva, bien focal o difusa. Este proceso se localiza en la mucosa y submucosa intestinal y ganglio linfático adyacente (fig. n° 4 y 5). Pudo observarse la presencia de macrófagos, linfocitos, células gigantes y plasmáticas en los cortes histológicos intestinales (fig. n° 6). Así mismo se observaron numerosos

eosinófilos en la lámina propia del intestino y la región sinusoidal de los ganglios linfáticos. En ocasiones, también se apreció la presencia de neutrófilos en la periferia del área infectada. Se detectó necrosis central en la mayoría de las lesiones focales intestinales.

Por otro lado, el macrófago fue la célula más abundante en las lesiones paratuberculosas (fig. n° 7). Algunos de ellos, se presentaron con el citoplasma distendido y la presencia de micobacterias en su interior (fig. n° 8).

Los análisis anatómo e histopatológicos sirvieron para realizar diagnóstico diferencial. En relación con otras causas de enfermedad caquectizantes, se encontró una elevada incidencia de Hidatidosis y algunos casos de Adenomatosis pulmonar.

A los animales sacrificados con bacterioscopia directa e histopatología positivas, se les consideró como positivos.

IV.1.3.- Resultados obtenidos a partir del cultivo microbiológico.

Los resultados de la siembra bacteriológica de las muestras no se correspondieron, en un elevado número de casos, con aquellos obtenidos a partir de la puesta en evidencia del germen de forma directa. Sin embargo, a pesar de no obtenerse crecimiento positivo, en general los individuos con signos clínicos, resultaron positivos mediante histopatología y bacterioscopia directa.

Se obtuvieron un total de 16 cepas. El periodo de crecimiento medio de los cultivos osciló entre 12 y 15 semanas. Las colonias presentaron una morfología de pequeño tamaño, color blanquecino y su número fue muy variable. En ocasiones sólo se obtuvo crecimiento en uno de los tubos sembrados. La contaminación fúngica fue la más habitual.

IV.1.3.1.- Resultados de los distintos tratamientos de las muestras.

Los resultados de la influencia sobre el crecimiento de las micobacterias en función del método de decontaminación de las muestras utilizado, se reflejan en la siguiente tabla (nº 3). Este ensayo previo, se realizó de forma pareada con un pequeño número de cepas aisladas (9) y se utilizaron dos agentes, uno el cloruro de benzalconio (amonio cuaternario) y otro el lauril sulfato sódico.

Tabla nº 3

RESULTADOS DEL CULTIVO MICROBIOLÓGICO EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO DECONTAMINANTE EMPLEADO

TRATAMIENTO CON:	CRECIMIENTO (+)	CRECIMIENTO (-)	TOTAL
LAURIL SULFATO	1	8	9
Cl BENZALCONIO	3	6	9

Como puede observarse en la tabla, mediante el empleo del cloruro de benzalconio se obtuvo un crecimiento positivo en 3 de las 9 muestras sembradas (33,3%), en contraste, solo existió crecimiento positivo en un caso, cuando se utilizó lauril sulfato (11,1%).

Por otro lado, a la vista de estos resultados y para contrastar aún más la eficacia de los dos tratamientos desde el punto de vista estricto de desinfección, se repitió y amplió este ensayo previo. Se sembraron un total de 72 tubos con las mismas muestras utilizadas anteriormente. Estas 9 cepas se cultivaron por cuadriplucado utilizando además soportes diferentes. Los resultados se reflejan en la tabla nº 4.

Tabla n° 4

**PORCENTAJE DE MUESTRAS CONTAMINADAS EN FUNCION DEL METODO
DE DECONTAMINACION UTILIZADO**

TRATAMIENTO	TUBOS CONTAMINADOS	TUBOS SEBRADOS	%
LAURIL SULFATO	9	36	25
Cl BENZALCONIO	3	36	8,3

Como se refleja en esta tabla debieron desecharse por contaminados un total de 9 tubos (25 %) cuando el inóculo fue tratado con lauril sulfato. Cuando se decontaminó con cloruro de benzalconio, solo hubieron de desecharse tres (8,3 %). Esta diferencia fue estadísticamente significativa mediante el test de chi cuadrado ($p < 0,05$).

Así mismo estos mismos resultados se expresan en la tabla n° 5, en la que se comparan el crecimiento y la contaminación de las muestras en función del tipo de material de los tubos de cultivo utilizados. Esta prueba se realizó para además contrastar la desecación sufrida a largo plazo de los cultivos, la facilidad de visualización de las colonias, y la influencia real sobre el crecimiento del tipo de soporte empleado para el cultivo microbiológico. El número de tubos desechados refleja estas circunstancias.

Tabla n° 5

**PORCENTAJE DE CONTAMINACION OBSERVADO EN FUNCION DEL TIPO
DE MATERIAL DE LOS TUBOS DE CULTIVO EMPLEADOS**

MATERIAL	DESECHADOS	SEMBRADOS	%
CRISTAL	7	36	19.44
POLICARBONATO	5	36	13.88

Puede observarse que los porcentajes de tubos desechados con ambos tipos de material son muy semejantes. No existió diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), sin embargo para uniformar el método se empleó en adelante solo vidrio, a pesar de su mayor coste económico y mayor trabajo de limpieza y esterilización. Estos presentaban una mejor y más rápida visualización de las colonias, y por tanto facilitaron el seguimiento de los cultivos.

IV.1.3.2. Resultados de las pruebas bioquímicas.

En cuanto a los resultados globales de las pruebas bioquímicas realizadas hay que mencionar que todas las cepas analizadas (16) resultaron negativas a la prueba de la Niacina. Sin embargo, se obtuvieron resultados variables mediante la prueba de la Catalasa a 68°C, la cepa de referencia siempre resultó positiva y 5 de las cepas de campo fueron negativas. Con respecto a la prueba de la hidrólisis del tween, la cepa de referencia siempre resultó negativa, mientras que 2 de las cepas aisladas mostraron una escasa producción de gas.

IV.1.4.Resultados de la incidencia de enfermedad en los rebaños estudiados durante 1988.

Los resultados generales sobre la incidencia de la Paratuberculosis en los 10 rebaños estudiados se expresan en la tabla n° 6. Las bajas se objetivaron mediante sacrificio de los animales que mostraron signos clínicos crónicos de adelgazamiento. El diagnóstico se consideró como positivo aún en ausencia de aislamiento, cuando la puesta en evidencia del germen causal de la enfermedad y la histopatología fueron positivas.

Tabla n° 6

PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN LOS REBAÑOS ESTUDIADOS DURANTE 1988

DENOMINACION REBAÑO PTB	PRODUCCION DESTINO	CENSO	INCIDENCIA
Fuentepelayo I	B	200	8%
Fuentepelayo II	B	500	3%
Fuentepelayo III	A	400	6%
Chatún	A	450	8%
Moraleja	A	250	2%
Olombrada	A	200	4%
Mozoncillo	B	400	0%
Vallelado	A	150	4%
Fuentes	A	250	4%
Pinarnegrillo	B	350	2%

Como puede observarse en la tabla n° 6 la tasa de incidencia clínica de la enfermedad osciló entre el 0% y el 8%. La **mediana** quedó situada en el 4% de bajas anuales tomando como unidad al rebaño. Se realizó una **media ponderada de cada uno de los rebaños en relación a sus efectivos**, así se obtuvo una **tasa de mortalidad del 4'06%**.

Las cifras comparadas de incidencia entre los distintos grupos de rebaños clasificados en función de su tipo de producción-destino-complejo racial se reflejan en la tabla n° 7.

Tabla n° 7

INCIDENCIA RELATIVA DE ENFERMEDAD SEGUN EL TIPO DE PRODUCCION DE LOS REBAÑOS, CON RESPECTO A LA MEDIA PONDERADA DE SUS EFECTIVOS

TIPO PRODUCCION	Nº REBAÑOS	CENSO ESTUDIADO	INCIDENCIA CLINICA
A	6	1.650	5.33%
B	4	1.450	2.62%
A+B	10	3.100	4.06%

Puede observarse que existió una clara diferencia en cuanto a mortalidad en ambos tipos de rebaños.

IV.2.RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE 1989 Y 1990

IV.2.1.-Resultados del estudio del rebaño sin incidencia clínica perteneciente a los analizados anteriormente.

Durante el estudio llevado a cabo para establecer la incidencia inicial de los 10 rebaños analizados se observó que el rebaño de Mozoncillo no presentó incidencia clínica de enfermedad. Debido a ello se procedió a un estudio más exhaustivo de este efectivo realizando una recolección de heces al azar sobre el 5% de sus efectivos. Las muestras de heces se sometieron a cultivo microbiológico y los resultados se muestran en la tabla n° 8.

Tabla n° 8

RESULTADOS DEL MUESTREO DEL REBAÑO MOZONCILLO

N° MUESTRA	EDAD AÑOS	RESULTADO CULTIVO	MORFOLOGIA COLONIAS	RESULTADOS
1	2-3	NEGATIVO	-	NEGATIVO
2	2-3	NEGATIVO	-	NEGATIVO
3	5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
4	1	NEGATIVO	-	NEGATIVO
5	7	NEGATIVO	-	NEGATIVO
6	4-5	±	NEGATIVO	NEGATIVO
7	4-5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
8	2	±	NEGATIVO	NEGATIVO
9	5-6	NEGATIVO	-	NEGATIVO
10	5-6	NEGATIVO	-	NEGATIVO
11	5-6	NEGATIVO	-	NEGATIVO
12	2	NEGATIVO	-	NEGATIVO
13	5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
14	5-6	NEGATIVO	-	NEGATIVO
15	5	POSITIVO	NO TIPICA	NEGATIVO
16	5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
17	4-5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
18	5	NEGATIVO	-	NEGATIVO
19	5	POSITIVO	TIPICA	POSITIVO
20	4-5	NEGATIVO	-	NEGATIVO

En total se procesaron 20 muestras, obteniéndose crecimiento positivo en dos casos: números 15 y 19. A partir del animal n° 15 se aisló un microorganismo micobactín-dependiente cuya morfología y características cromáticas no se ajustaron a las descritas para M. paratuberculosis. Por otro lado, las pruebas bioquímicas tampoco confirmaron la identidad de este agente, así se consideró, por tanto, como muestra negativa.

En el caso del animal n° 19 las características morfológicas y bioquímicas sí correspondieron a las del agente causal buscado, cuando se comparó con la cepa de referencia.

Como resultado de estas observaciones se concluyó que en el 100% de los rebaños estudiados, durante 1988 y en este caso del rebaño de Mozoncillo durante 1989, existió infección por M. Paratuberculosis.

IV.2.1. Resultados obtenidos a partir de dos rebaños sometidos a un programa sanitario y de vacunación durante 1989 y 1990.

El programa sanitario y de vacunación empleado se restringió a dos de los rebaños más afectados: Fuentepelayo I y Chatún, ambos con un 8% de incidencia clínica de Paratuberculosis. La introducción de distintas medidas correctoras de tipo higiénico-sanitario así como los cambios sobre el sistema de alimentación no resultó especialmente problemática. Sin embargo, la administración de vacunas sí planteó ciertas reticencias por parte del ganadero, debido a que provocan algunas reacciones desfavorables sobre los efectivos, como la lentificación en el crecimiento de los corderos y los retrasos en la cubrición de las hembras (Tejedor, 1986; Adúriz y col. 1989; López, 1989).

El diagnóstico y la objetivación de las bajas se realizó como en los casos anteriores.

Los resultados en cuanto a la disminución de la incidencia clínica de Paratuberculosis en estos dos rebaños se expresan en la tabla n° 9.

Tabla n° 9

RESULTADOS DE INCIDENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN DOS REBAÑOS SOMETIDOS A UN PROGRAMA SANITARIO Y DE VACUNACION

DENOMINACION REBAÑO	INCIDENCIA INICIAL	1er AÑO	2° AÑO
FUENTEPELAYO I	8%	5%	3%
CHATUN	8%	2%	1.5%

La administración de vacunas junto a las medidas de tipo higiénico aplicadas en los dos efectivos provocaron un descenso notable en la incidencia clínica de la enfermedad durante los dos años de seguimiento conjunto.

En el rebaño de Fuentepelayo I disminuyó durante el segundo año de seguimiento hasta el 5% y durante el tercero hasta el 3%. En este efectivo una de las corderas vacunadas murió de enterotoxemia durante el primer año de vida. Tras la necropsia se comprobó la presencia de lesiones de tipo granulomatoso en la mucosa intestinal. Fue sometida a cultivo con resultados positivos, al igual que un macho adulto vacunado, esta vez a partir de heces. Sin embargo ningún individuo vacunado de este efectivo desarrolló sintomatología clínica durante el período de estudio.

En el rebaño Chatún también se produjo una disminución de la mortalidad, rebajándose desde el 8% inicial al 2% durante el segundo año de seguimiento. Sin embargo, no se lograron cotas inferiores al 1'5% a pesar de continuar en este rebaño la política profiláctica más allá del tercer año.

Un hecho a señalar fue que entre las corderas vacunadas el primer año en el rebaño Chatún (un total de 119), se registraron algunas bajas por manifestación clínica de Paratuberculosis. También existieron bajas durante los tres años posteriores, en total un 1'68%.

Puede apreciarse a la vista de estos resultados, que la eficacia de la vacunación fue mayor en el rebaño Chatún.

IV.3. RESULTADOS OBTENIDOS EN MATADERO DURANTE LOS AÑOS 1990 Y 1991

IV.3.1. Eficiencia diagnóstica de la Bacterioscopia Directa sobre animales sanos.

Inicialmente se realizó una evaluación de la Bacterioscopia directa como prueba diagnóstica referida a animales clínicamente sanos sin sintomatología aparente. La puesta en evidencia de la micobacteria se realizó sobre un total de 66 animales, los resultados obtenidos comparados con los del cultivo microbiológico de válvula se expresan en la tabla n° 10.

Tabla n° 10

**COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR
DE LA BACTERIOSCOPIA DIRECTA Y EL CULTIVO DE ZONA
ILEOCECAL**

	cultivo +	cultivo -	total
Z-N +	5	7	12
Z-N -	9	45	54
total	14	52	66

En esta tabla puede apreciarse que de 14 animales con resultado positivo al cultivo, tan sólo 5 resultaron positivos mediante bacterioscopia directa, y éstos exhibieron resultados levemente positivos (+) o positivos (++), mediante la técnica de Ziehl-Neelsen y según clasificación previamente establecida por nosotros (aptdo. IV.1.1.)

En la tabla n° 11 se comparan los resultados de la bacterioscopia directa con la calificación final del individuo. Esta calificación de enfermo o no enfermo se ha establecido para cada individuo a partir de los resultados obtenidos con todas las pruebas realizadas.

TABLA n° 11

COMPARACION DE RESULTADOS DE BACTERIOSCOPIA DIRECTA CON LA CALIFICACION FINAL DEL INDIVIDUO

	ENFERMO	NO ENFERMO	TOTAL
Z-N +	8	4	12
Z-N -	11	43	54
TOTAL	19	47	66

A partir de los datos representados en esta tabla se calcularon la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y la eficiencia de la prueba. Los resultados se especifican a continuación

SENSIBILIDAD: 42%

ESPECIFICIDAD: 91.5%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: 67%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: 80%

EFICIENCIA DE LA PRUEBA: 77%

IV.3.2. Eficiencia diagnóstica de los cultivos microbiológicos sobre animales sanos.

También para realizar una evaluación de los cultivos microbiológicos como prueba diagnóstica referida a animales clínicamente sanos, se sembraron muestras procedentes de mucosa intestinal de la zona íleo-cecal y de heces. Se analizaron un total de sesenta ovinos adultos. Los resultados de las siembras se exponen en la tabla n° 12.

TABLA n° 12

RESULTADOS DE CULTIVOS A PARTIR DE VALVULA ILEO-CECAL O HECES

CULTIVO DE...	VALVULA +	VALVULA -	TOTAL
HECES +	3	7	10
HECES -	11	39	50
TOTAL	14	46	60

En esta tabla pueden observarse un total de 24 resultados positivos (que corresponden a 21 individuos) bien a partir de heces, bien a partir de válvula. Sin embargo tan sólo tres resultados positivos coinciden, lo que supone un deficiente grado de acuerdo entre ambas ($k=0.2$).

Los datos de los resultados del cultivo de mucosa intestinal de la zona íleo-cecal (válvula) referidos a individuos, considerando a los enfermos como aquellos de los que se obtiene un resultado positivo en alguna de ambas pruebas se reflejan en la tabla n°13.

TABLA 13

EFICIENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE VALVULA

	ENFERMOS	NO ENFERMOS	TOTAL
CULTIVO +	14	0	14
CULTIVO -	4	39	46
TOTAL	21	39	60

A partir de los datos representados en esta tabla se calcularon los valores de eficiencia de la prueba. Los resultados se especifican a continuación

ESPECIFICIDAD: 100%

SENSIBILIDAD: 67%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: 100%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: 85%

Con respecto a la eficiencia del cultivo microbiológico de heces los resultados referidos a individuos se reflejan en la tabla n° 14, a partir de la cual también se calculan los datos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y eficiencia.

TABLA 14

EFICIENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE HECES

	ENFERMOS	NO ENFERMOS	TOTAL
CULTIVO +	10	0	10
CULTIVO -	11	39	50
TOTAL	21	39	60

ESPECIFICIDAD: 100%
SENSIBILIDAD: 48%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO: 100%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: 78%

Estos datos muestran que pese a la alta especificidad concedida a estas pruebas diagnósticas, su sensibilidad resultó poco elevada, particularmente cuando el análisis se llevó a cabo a partir de heces.

IV.3.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MATADERO EMPLEANDO AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE M. paratuberculosis.

Una vez contrastadas las pruebas diagnósticas en animales sanos, se realizó una toma de muestras aleatoria sobre un total de 104 individuos adultos de más de dos años de edad. Se utilizó el cultivo microbiológico a partir de mucosa intestinal de válvula ileo-cecal en función de los resultados obtenidos previamente y reflejados en los apartados IV.3.1. y IV.3.2. Los mataderos donde se realizó la prospección fueron los de Cuéllar, Carbonero el Mayor y Fuentepelayo, en todos los casos los animales muestreados provenían de la zona de influencia de cada matadero.

El número de individuos muestreados en cada matadero, así como el resultado referido a aquellos animales con algún cultivo positivo a partir de mucosa intestinal, se reflejan en la tabla nº 15. La prevalencia de la enfermedad en la comarca de influencia de cada matadero se calculó a partir de estos datos.

TABLA n° 15

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MATADERO

MATADERO	NUMERO MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PREVALENCIA (%)
CUELLAR	33	6	18.18
CARBONERO	21	4	19.05
FUENTEPELAYO	50	9	18.00
T O T A L	104	19	18.27

Estos resultados muestran una elevada prevalencia en la zona estudiada. La distribución de la enfermedad fue muy semejante en los tres mataderos estudiados. En la comarca donde se ubica el matadero de Cuéllar predominan casi de forma exclusiva rebaños pequeños de raza churra y aptitud láctea (complejo racial A), mientras que los animales muestreados en Carbonero y Fuentepelayo provienen de otra comarca donde son ampliamente mayoritarios los rebaños del complejo racial B. En este sentido, estos resultados obtenidos no parecen coincidir con los datos de incidencia clínica de la enfermedad en ambos grupos de población (aptdo. IV.1.4).

IV.3.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MATADERO MEDIANTE EL EMPLEO DE TECNICAS SEROLOGICAS.

A fin de estudiar la prevalencia serológica de la enfermedad y contrastar las dos técnicas más usadas para el diagnóstico (AGID y ELISA), se analizaron 286 muestras de suero, de ellas 61 correspondieron a animales adultos, y 225 a animales jóvenes mayores de 3 meses de edad.

IV.3.4.1. Resultados de la prueba de Agar Gel Inmuno Difusión (AGID).

Del total de 61 sueros de animales adultos sanos procesados mediante esta técnica se obtuvieron tres resultados positivos (4,9%, ver tabla nº 14). En cinco casos más se observó la formación de precipitados en forma de "bandas internas" en el gel (comentada su posible significación en el apartado III.9.1. de Material y Métodos), los cuales se consideraron como resultados negativos.

De los 225 sueros de corderos sacrificados en matadero, mediante esta técnica sólo se obtuvo un resultado positivo, no observándose en ningún caso la presencia de "bandas internas".

IV.3.4.2. Resultados del enzimoimmunoensayo.

El protocolo de la técnica empleada considera como resultados positivos a aquellos sueros que presenten una densidad óptica mayor del 90% de la media obtenida por los sueros control positivos en cada placa. De los 61 sueros analizados de ovinos adultos se obtuvieron un total de 8 positivos (lo que representó un 13%, ver tabla nº 14). Sin embargo cuando se consideró como punto de corte el 100% de la media de la D.O., se obtuvieron sólo 5 sueros positivos. Las tres muestras positivas restantes entre ambos valores de referencia (90% y 100% de la media de la D.O.) resultaron ser precisamente los sueros que mediante AGID exhibieron una "banda interna".

La aplicación de la técnica inmunoenzimática sobre los 225 sueros de animales jóvenes, ofreció 17 resultados positivos (lo que representó un 7,5%) para un punto de corte del 90%. Sin embargo cuando este punto de corte fue del 100% se obtuvieron 12 resultados positivos (5,3%).

El único suero de cordero que resultó positivo mediante AGID, también fue positivo mediante ELISA cuando el punto de

corte era del 90%. Resultó en cambio negativo cuando se consideró el 100%.

IV.3.5. COMPARACION DE RESULTADOS DIAGNOSTICOS SEGUN LA TECNICA EMPLEADA.

Todos los resultados de las técnicas serológicas se reflejan en la tabla n° 16:

TABLA n° 16

RESULTADOS DEL ANALISIS SEROLOGICO EN ANIMALES DE MATADERO

EDAD	TOTAL SUEROS	+ AGID	%	+ ELISA 90%	%	+ ELISA 100%	%
ADULTOS	61	3	4,9	8	13	5	8,2
CORDEROS	225	1	0,4	17	7,5	12	5,3

Con respecto a la concordancia entre ambas pruebas serológicas empleadas, resultó que existieron nueve adultos que fueron positivos a alguna de ellas. De ellos, dos resultaron positivos mediante ambas, observándose una proporción de acuerdo del 22.22%

Por otro lado a fin de valorar la concordancia entre las dos técnicas serológicas empleadas, con el aislamiento e identificación de M. paratuberculosis, se analizó una muestra de 27 animales adultos con las tres técnicas.

De los 27 individuos analizados se obtuvo cultivo positivo en 8 de ellos (lo que representa un 29,6%). Sin embargo mediante AGID sólo se detectaron 2 animales positivos (lo que representa un 7.4%), y 3 positivos con ELISA (el 11.1%). Tan sólo en un caso los resultados de las tres técnicas utilizadas coincidieron.

Resulta interesante reseñar que el individuo n° 12 era un animal de aproximadamente un año de edad, que había sido vacunado (procedía de uno de los rebaños controlados por nosotros), y del que se obtuvo un resultado positivo al cultivo y mediante la técnica de ELISA, mientras que resultó negativo con AGID.

En la tabla n° 17 pueden observarse los resultados desglosados (sobre la muestra de 27 individuos) técnica a técnica entre las tres comparadas, así como los resultados agrupados dos a dos pruebas.

TABLA n° 17

RESUMEN PRUEBA COMPARATIVA

TEST	Nº POSITIVOS	%
CULTIVO	8	29,6
AGID	2	7,4
ELISA	3	11,1
AGID + CULTIVO	1	3,7
AGID + ELISA	2	7,4
ELISA + CULTIVO	2	7,4

Puede observarse que los porcentajes finales en cuanto a mayor detección de positivos corresponde al cultivo microbiológico. Por otro lado, los porcentajes obtenidos, cuando se comparan pareadamente las tres pruebas empleadas, resultan idénticos en los casos de las dos pruebas serológicas y en el caso del enzimoimmunoensayo más el aislamiento.

Por último, en la tabla n° 18 se encuentran reflejados todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio, en cuanto a distribución de la enfermedad en el área analizada.

Se expresan porcentualmente agrupados en función de las distintas fases de la investigación y en función de la técnica utilizada.

TABLA n° 18

**DISTRIBUCION DE LA ENFERMEDAD EN LA ZONA ESTUDIADA
SEGUN EL METODO EMPLEADO**

INCIDENCIA Bajas/año	PREVALENCIA cultivo	PREVALENCIA AGID	PREVALENCIA ELISA
4.06%	18.27%	4.9%	13%

Pueden observarse, en principio, diferencias notables. Sin embargo, cuando se analizan las poblaciones estudiadas y se considera la eficacia de cada método diagnóstico empleado, estas diferencias se encuentran compensadas, como podrá deducirse a largo de la discusión.

V. DISCUSSION

V. DISCUSION

A lo largo del ejercicio profesional como veterinario clínico en la zona estudiada, pudimos observar la existencia de una elevada difusión de la paratuberculosis en el ganado ovino. Este proceso origina una elevada letalidad y carece de tratamiento efectivo en la actualidad, todo ello nos llevó a considerar que la única forma de controlar la enfermedad era aplicar medidas de tipo preventivo, para lo que sería necesario conocer, en un principio, los niveles de incidencia y prevalencia en la mencionada area geográfica para poder aplicar un programa sanitario. Sería, así mismo, preciso evaluar la viabilidad económica de las posibles medidas de control a emplear, y, por otro lado, sería interesante conocer la eficacia de las mismas incluida la vacunación.

SOBRE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO

Para comenzar fué preciso verificar y establecer unos métodos de diagnóstico eficaces.

El diagnóstico basado sobre datos clínicos y epidemiológicos resulta perfectamente válido para orientar al veterinario, a cargo de una explotación, hacia una primera valoración e iniciar las primeras acciones encaminadas a la prevención basadas en medidas higiénicas generales. Esto sucede, especialmente, cuando no se ha obtenido respuesta frente a los diferentes tratamientos empleados y el grado de parasitación del rebaño es poco elevado.

En cualquier caso, siempre se deberá confirmar un diagnóstico inicial de paratuberculosis mediante análisis anatomopatológico y bacterioscópico, ya que el valor económico individual carece de importancia. Estos métodos de diagnóstico de la enfermedad en el rebaño son sencillos y rápidos de realizar, y ante un resultado positivo la interpretación de la presencia de enfermedad en el rebaño es concluyente (Juste, 1984; Fuentes, 1988c).

En nuestro estudio pudimos correlacionar todas las bacterioscopias a partir de mucosa intestinal que fueron positivas con grado "+++" como pertenecientes a animales clínicamente enfermos.

Como método de diagnóstico en general la bacterioscopia a partir de heces ofrece una sensibilidad del 25% (Summers y col., 1981, Chiodini y col., 1984, Brugère Picoux y col., 1987), sin embargo en nuestro caso hemos obtenido resultados variables. Cuando la bacterioscopia se realizaba sobre raspados de mucosa intestinal, se obtuvo una sensibilidad del 42% y una especificidad del 91.5% .

A pesar de ello no cabe duda de que el análisis definitivo correspondería al bacteriológico, bien a partir de mucosa intestinal, bien a partir de heces. De nuevo, mediante esta técnica, la sensibilidad resultó poco elevada así como la repetibilidad en la especie ovina. La mayoría de los autores como Merkal y col. (1984), Chiodini y col. (1984), McNab y col. (1991b) no consideran estos métodos como aptos para resultados individuales, pero sí adecuados cuando se trata del diagnóstico de la enfermedad en un rebaño.

En cuanto al proceso de desinfección de la muestra, éste, supone otra de las dificultades del análisis bacteriológico. De los distintos métodos históricamente empleados, la mayor parte de los autores coinciden en que uno de los más útiles es el empleo de detergentes catiónicos (MerKal y col. 1973; Jorgensen, 1982; Chiodini y col. 1984) destacando el cloruro de benzalconio.

Más recientemente se han descrito algunas ventajas en cuanto al empleo del cloruro de hexa-decil piridinio (Juste y col. 1989b). En nuestro caso hemos utilizado el primer agente ya que se obtuvieron buenos resultados con él.

Para llegar a esta conclusión se comparó la eficacia de un detergente catiónico con otra técnica empleada en los hospitales y laboratorios de Salud Pública para el aislamiento del M. tuberculosis (Manrique, 1988) basada en

la desinfección con lauril sulfato sódico y posterior neutralización con ácido fosfórico. Los resultados obtenidos con un 33.3% de crecimiento con la utilización del primer agente y un 11.1% con la segunda técnica, así como un 8.3% de contaminación con el primero y un 25% con la segunda, avalaron el uso de los detergentes para posibilitar la detección de M. paratuberculosis. Así mismo se simplificó el trabajo en el laboratorio ya que no fue necesaria la neutralización si el medio contiene yema de huevo.

En cuanto a los medios de cultivo utilizados, algunos de los más empleados son el Herrolds y el Lowenstein-Jensen, ambos suplementados con yema de huevo. Mediante el empleo del primero se obtienen buenos resultados para el crecimiento de cepas de origen vacuno (Juste y col. 1989b). Para muestras de origen ovino usualmente se utiliza el segundo. El medio Lowenstein-Jensen modificado propuesto por Fuentes (1988) está basado en la adición de DNA y la sustitución de la clara de huevo por agar como agente solidificante.

Este medio facilitó la visualización de las colonias al presentar una superficie más lisa y más consistente. En nuestro caso, pudieron observarse estas ventajas, sin embargo el número de colonias obtenido fue poco elevado, ello fue posiblemente debido a la concentración de antibióticos. El medio Lowenstein-Jensen rutinariamente utilizado en nuestro estudio fue el modificado por Juste y col. (1989b). Los tiempos de generación de colonias fueron semejantes en ambos casos a los observados por estos autores.

La identificación se realizó en función de la micobactina dependiente, la lentitud del crecimiento y la morfología típica de las colonias. Estas características resultan suficientes a efectos de diagnóstico práctico (Chiodini, 1986).

Las únicas micobacterias con las que podría existir un cierto grado de dificultad en cuanto a su diferenciación, son cepas de M. avium micobactina dependientes; en contraste, éstas se generan en 1 o 2 semanas.

A partir de aquellas cepas en las que se pudo obtener suficiente inóculo de resiembra, se llevaron a cabo diversas pruebas bioquímicas. Sus resultados fueron variables a excepción de la prueba de producción de niacina, que en todos los casos resultó negativa.

La variabilidad de resultados para las pruebas de hidrólisis del tween y producción de catalasa, han sido también observadas por otros autores como MerKal (1966), Thorel y col. (1979), Wayne y col. (1986), Manrique (1988), Marco y col. (1990), existiendo una gran heterogenicidad entre sus resultados.

La mayor parte de los autores que han estudiado la paratuberculosis, coinciden en otorgar la máxima especificidad, entre todas las técnicas empleadas, al cultivo microbiológico (100%) (MerKal, 1973, Lagadie y col., 1983, Fuentes, 1988, Juste y col., 1990a). Sin embargo, cuando hay que referirse a la sensibilidad no se suele recurrir al empleo de cifras exactas. Tan solo se expresa la necesidad de al menos 100 micobacterias por gramo de heces para observar crecimiento en el cultivo (MerKal y col., 1968, Desmecht, 1977, Lagadie y col., 1983).

Estos mismos autores así mismo comunican resultados discordantes entre la bacterioscopia directa y el aislamiento microbiológico, semejantes a los obtenidos por nosotros. Así, algunos animales con bacterioscopia e histopatología positivas resultaron negativos mediante aislamiento. Estos resultados se pueden justificar debido a la presencia de un bajo número de bacterias en la muestra (< de 100/gr.), añadiéndose a este factor la dificultad de crecimiento de las cepas de origen ovino (Juste y col., 1990a, Carrigan y col., 1990).

Por otro lado, Fuentes (1988) cuantifica en un 92,73% la sensibilidad del cultivo microbiológico a partir de heces, mientras que Sherman y col. (1980) trabajando con cabras le otorgan un 77,5% (idéntica sensibilidad que la obtenida con el empleo de la técnica AGID). En nuestro estudio se

obtuvieron cifras del 67% para el cultivo a partir de válvula y del 48% para el de heces, inferiores a lo comunicado por los mencionados autores. Sin embargo nuestros resultados podrían justificarse en base a la dificultad del cultivo de las cepas ovinas, como ya se ha mencionado anteriormente.

En cualquier caso esta técnica proporcionaría resultados concluyentes para el diagnóstico de la presencia de enfermedad en colectividades, aunque resulta insuficiente para el diagnóstico individual.

El aislamiento a partir de heces, además de la baja sensibilidad presenta una escasa repetibilidad en pequeños rumiantes (Méndez y col. 1991). A pesar de todo ello coincidimos con la opinión de Chiodini y col. (1984), Merkál (1989), Brugère y col. (1987), Méndez y col. (1991) y otros autores, quienes expresan que dada la falta de medios efectivos para la investigación de la presencia de enfermedad a nivel individual, el cultivo de heces resulta una técnica adecuada para detectar la infección de animales aparentemente sanos. Estos animales son precisamente los que estarían difundiendo el agente infeccioso entre el rebaño, por lo que aunque no se consiga un eficacia del 100%, utilizando esta técnica el saneamiento sería paulatino.

En cuanto al diagnóstico serológico, es preciso que la técnica empleada sea de fácil automatización y obtenga resultados rápidos y concluyentes. Esa técnica ideal no existe en la actualidad, si bien para el ganado bovino el enzimoimmunoensayo ofrece unos resultados esperanzadores. Este método empleado con sueros ovinos y caprinos proporciona resultados variables y escasa repetibilidad (Juste y col. 1990a).

En nuestro estudio, utilizando la técnica de ELISA, se obtuvo un 13% de sueros positivos para animales adultos, y un 7,2% entre los de animales jóvenes. Esta última cifra en principio parece elevada e indicaría que los anticuerpos detectados mediante esta técnica serían de aparición temprana. La edad de los animales muestreados (mayores de

tres meses) descartaría la idea de que estos anticuerpos detectados pudieran ser de origen calostrado, considerándose así más factible que su origen se debiese a un rápido contacto con el agente patógeno durante las primeras semanas de vida.

Así mismo mediante ELISA se pudo observar un elevado índice de positividad entre sueros procedentes de animales vacunados. Cuando el punto de corte fue del 100% de la media de los sueros control, esta técnica discriminó sueros que mediante AGID produjeron bandas internas, consideradas como negativas.

Según Merkal (1989) la adsorción del suero con M. phlei, no evita las reacciones cruzadas debidas a anticuerpos frente a otras micobacterias como M. avium, M. bovis y M. tuberculosis. Estos dos últimos microorganismos se encuentran erradicados en EE.UU, así al utilizar el enzimoimmunoensayo en otros países como México, no resultaba tan específico. El mismo autor observa con esta técnica en ovino y caprino una sensibilidad semejante al cultivo microbiológico.

Juste y col. (1989a) utilizando la técnica del enzimoimmunoensayo con el antígeno PPA-3, también empleado por nosotros, concluyen que el método de lectura óptimo es el que se aplica con un punto de corte del 90% (media de la D.O. de los sueros control). Así obtienen una sensibilidad del 74% y una especificidad del 85%. Cuando se eleva el punto de corte al 100% observan un ligero aumento en la especificidad, pero un descenso notable en la sensibilidad. La elección del primer punto de corte como estándar estaría también relacionada con la baja respuesta humoral que desencadena la infección natural.

Por otro lado, Molina y col. (1989) empleando otro método ELISA también con el antígeno PPA-3, obtienen una sensibilidad del 86% y una especificidad del 95% en sueros caprinos. No hallan diferencias significativas al absorber los sueros con M. phlei. Así mismo estos mismos autores en 1990 relacionan la eficacia de la técnica con la prevalencia

de la enfermedad, de tal forma que a baja prevalencia la sensibilidad será menor.

Merkal (1989) considera que la AGID detecta anticuerpos de generación más tardía que en el caso del ELISA, siempre previos al desarrollo de la enfermedad clínica. Para Sherman y col. (1980) la inmunodifusión presentaría unas sensibilidad y especificidad semejantes al cultivo de heces. Juste y col. (1989a) observan para la técnica de AGID una sensibilidad del 67,7% y una especificidad del 100%. Además sugieren la posibilidad con el empleo de esta técnica, de diferenciar animales vacunados debido a la producción de distintas bandas.

En nuestro estudio mediante la técnica de AGID sólo se pudo observar un resultado positivo entre los sueros de animales jóvenes (0.4%). Ello estaría de acuerdo con la tardía aparición de este tipo de anticuerpos así como con la alta especificidad de la técnica anteriormente mencionados. En los sueros de ovinos adultos sacrificados en matadero se pudo apreciar un 4,9% de resultados positivos. Probablemente, según Merkal, estos animales serán los que en un plazo aproximado de un año desarrollarán la enfermedad clínica. Esta cifra se aproxima a nuestro dato de la incidencia anual de la enfermedad en la zona de Cuéllar (5,33%), de cuyo matadero están recogidas las muestras para análisis serológico mayoritariamente.

Cuando se comparan los resultados obtenidos mediante ambas técnicas empleadas en los mismos grupos de edad (4.9% para AGID y 13% con ELISA), parece evidente decantarse por la elección del enzimoimmunoensayo dada su alta sensibilidad, y en función de ello resultaría útil para evitar la introducción de portadores en un rebaño exento. En contraste, debido a su menor especificidad y a la baja repetibilidad de los resultados en la especie ovina, junto a una elevada prevalencia de la enfermedad, consideramos que esta técnica debe ser mejorada antes de poder ser empleada de forma masiva en campañas de erradicación o control (Juste y col. 1989a).

Se ha intentado correlacionar la aparición de "bandas internas" en los geles con la presencia de anticuerpos vacunales (Juste y col. 1989); sin embargo en nuestro estudio se ha detectado la presencia de estas bandas en sueros de ovinos procedentes de rebaños controlados en los que no se había practicado nunca la vacunación frente a esta enfermedad. En cambio no se observó su presencia en sueros procedentes de animales vacunados. Estas bandas se observaron únicamente en el grupo de edad de adultos. En cualquier caso la aparición de bandas internas en sueros, incluso positivos mediante ELISA, denotaría un contacto previo con el agente causal de la enfermedad u otra micobacteria que induciría una reacción cruzada.

La proporción observada de acuerdo obtenida entre ambas pruebas fue del 22.2%, cifra muy superior al 2.1% obtenida por Juste y col. (1989a). Esta notable diferencia podría deberse no sólo a la menor prevalencia de la enfermedad en la población por ellos analizada sino también a diferencias estadísticas, ya que ellos trabajaron con mucho mayor volumen de muestra y tipo de población encuestada que en nuestro caso.

Todo lo anteriormente expuesto, así como el trabajo de Shulaw y col. (1993) quienes comunican que todos los reaccionantes positivos a AGID presentaban lesiones histológicas típicas de la enfermedad o positividad a la bacterioscopia directa, nos llevarían a considerar que la inmunodifusión es una técnica muy recomendable en ovino para programas de detección y eliminación de positivos. Esta misma opinión coincide con la de otros autores como Sherman y col. (1989) y Juste y col. (1990), entre otros. Con el fin de lograr un control efectivo de la enfermedad la prospección mediante AGID debería tener al menos periodicidad anual, sin plantearse un programa de erradicación que requeriría el uso de otras técnicas más sensibles, así como un importante soporte financiero.

LA INCIDENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS EN LA ZONA ESTUDIADA.

La elección de los rebaños no se realizó al azar, se procuró la máxima representatividad entre los de los municipios encuestados a fin de poder abarcar la mayor extensión geográfica posible. Los resultados permitieron constatar la presencia del agente en la totalidad de los rebaños analizados y los métodos de diagnóstico utilizados se aproximaron a un 100% de especificidad.

Los trabajos destinados a determinar la distribución de la enfermedad en distintas áreas geográficas son escasos, predominando los realizados sobre la especie bovina. En este sentido Doyle y Spears en 1951 (tomado de Juste, 1988) aislaron M. paratuberculosis a partir del 25% de las heces de 4000 bovinos procedentes de 30 condados diferentes de Gran Bretaña. En Francia a principios de siglo las muertes por esta enfermedad se cifraban en un 8% del censo bovino. En EE.UU a partir de diversos estudios llevados a cabo en matadero (en distintos estados) se obtuvieron prevalencias variables oscilando desde el 18% (Chiodini y col. 1986) al 1,6% (Merkal y col., 1987). En Ontario (Canadá) McNab y col. (1991a) mediante un enzimoimmunoensayo estiman una prevalencia del 6,1%.

En ganado caprino Milner y col. (1989) estimaron que en Australia el 97% de los rebaños estarían afectados por la enfermedad. En nuestro país Garrido y León (1979) describieron en Andalucía los primeros focos de la enfermedad; Gasca (1984) encontró reaccionantes positivos mediante fijación de complemento en el 20 y 36,8% de los rebaños de Cádiz y Sevilla, respectivamente. Molina y col. (1989, 1990) confirman la amplia difusión de la enfermedad entre el caprino andaluz.

En cuanto a la distribución en ganado ovino las referencias más notorias son las realizadas en nuestro país. Badiola y col. (1988) en la comunidad de Aragón detectaron mediante la puesta en evidencia del agente, la presencia de

paratuberculosis en el 60% de los rebaños encuestados, y mediante inmunodifusión obtuvieron el 5% de sueros positivos a nivel individual. Juste y col. (1987) en el País Vasco obtuvieron algún resultado positivo en el 88% de los rebaños estudiados empleando la técnica de fijación de complemento. Fuentes (1988) mediante cultivo de heces obtiene un 54,9% de animales infectados en tres provincias de la zona centro (trabajando con ovino y caprino pertenecientes a cuatro rebaños infectados). Por último, Perea y col. (1990) de todos los diagnósticos realizados en la Facultad de Veterinaria de Córdoba durante el período 1982-89, detectaron la presencia de paratuberculosis en el 21.09% de los caprinos, y en el 11.11% de los ovinos analizados.

En nuestro caso, se empleó un planteamiento semejante al de Badiola y col. (1983) basado en la confirmación de la enfermedad en rebaños por métodos anatomopatológicos y bacteriológicos. Los rebaños de la zona estudiada de la provincia de Segovia se encontraron afectados en un 100%. Esta cifra es bastante superior a las obtenidas en Aragón y en el País Vasco, sin embargo concuerda con los datos de distribución de vacuna del MAPA durante el quinquenio 87-91 en relación al censo de cada CC.AA (Figura 7 y 8). Se puede observar que la demanda de vacuna en la comunidad autónoma castellano-leonesa es 19,6 veces superior a la del País Vasco y 7,6 veces superior a la de Aragón, siendo comparable con la demanda de Castilla la Mancha.

En cuanto a la tasa de incidencia, basada en el número de animales enfermos por año, nuestros resultados fueron de un 2.62% para rebaños de razas y manejo cárnico, y de un 5.33% para los de manejo y razas productoras de leche, con una media del 4.06%. Esta cifra resulta bastante inferior a la obtenida por Fuentes del 14,08% (quien trabaja sólo con 4 rebaños afectados clínicamente), así mismo también resulta inferior al dato facilitado por Perea y cols (1990) de un 11.11% de los animales enfermos en Andalucía. Sin embargo estos datos no pueden ser comparables, ya que los últimos no se han obtenido en base a un muestreo de población general, sino sólo de rebaños o de animales enfermos.

PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD. SUS RELACIONES CON LOS SISTEMAS DE MANEJO.

En cuanto a la aproximación al número real de infectados o de portadores el método que nos pareció más idóneo fue el análisis bacteriológico de una muestra aleatoria de los animales adultos sacrificados en matadero. Con este sistema se descartan animales caquéticos sin valor comercial, ya que suelen ser sacrificados en la propia explotación y no llegan a estas instalaciones. De los 104 animales analizados se obtuvo una tasa de prevalencia del 18.27% de infectados, cifra elevada que concuerda con la amplia extensión de la enfermedad clínica en estas comarcas. A su vez este dato fue obviamente inferior al porcentaje de individuos infectados detectados mediante cultivo de heces en los rebaños (con enfermedad clínica) estudiados por Fuentes (1988) quien obtuvo un 54,9%.

Si se desglosan las cifras en función de los mataderos de procedencia de las muestras se puede observar una gran analogía, que en principio no coincidiría con los resultados de la incidencia de la enfermedad. Así, en los mataderos de Carbonero y Fuentepelayo, en los que se sacrifican principalmente ovinos adultos procedentes de rebaños de carne, se obtuvieron unas prevalencias del 19.05% y 18.00% respectivamente. En el de Cuéllar donde se sacrifican ovinos de aptitud y razas de leche la prevalencia obtenida fue del 18.18%. Estos datos nos sugieren que las diferencias en cuanto a la incidencia clínica de la enfermedad se deberían quizá más a factores de manejo que a la presencia del agente etiológico en la población.

Un hecho semejante recoge Garrido (1987) para el ganado caprino. Este autor estima en rebaños de tipo extensivo que se desarrolla la enfermedad en el 4% de los animales que padecen la infección, mientras que en rebaños de tipo intensivo el número de casos clínicos asciende al 20%. En el estudio de Fuentes (1988) sobre cuatro rebaños con la enfermedad clínica, se obtiene un 26,92% de enfermos sobre el total de infectados. La proporción obtenida en nuestro

estudio de enfermos entre los infectados fue del 29.2% para los rebaños de raza-aptitud láctea y manejo intensivo y de un 14.3% para los rebaños de raza-aptitud cárnica y manejo semiextensivo.

No se encontraron por tanto diferencias raciales en cuanto a la distribución del agente etiológico en ambos tipos de población. El hecho de que, a pesar del diferente sistema de manejo, las tasas de prevalencia sean tan semejantes se podría justificar debido a que no existen diferencias significativas en cuanto a manejo durante las primeras semanas de la vida en ambos tipos de explotación. Ello se debe a que el uso de la lactación artificial no se encuentra suficientemente extendido, ni siquiera en los rebaños de leche. Así las condiciones de manejo, alojamientos y alimentación durante la paridera y el período de lactancia son semejantes en ambos tipos de explotación.

Por el contrario, Merkal y col. (1987) en una encuesta realizada sobre animales de matadero en Wisconsin, sí observan diferencias en cuanto a la prevalencia entre rebaños bovinos de carne y de leche. Estos autores obtienen un 0,8% de positividad para los primeros, y un 2,9% para los segundos. Sin embargo, en la producción de vacuno de leche no ocurre lo comentado anteriormente con el ovino, encontrándose mayoritariamente implantada la lactación artificial en los terneros, lo que limita la difusión del agente.

En cuanto a las cifras de prevalencia obtenida mediante análisis serológico, los resultados observados con la técnica de la inmunodifusión (4,9%) fueron muy semejantes a los comunicados por Badiola y col. (1988). Estos últimos autores obtuvieron un 5% de positividad a nivel individual. A pesar de esta coincidencia, la diferencia en cuanto al número de rebaños afectados clínicamente (60% en su estudio, 100% en el nuestro) es notable, ello se debería a que en la Comunidad de Aragón predominan rebaños de aptitud cárnica y manejo extensivo, así como a la toma de muestras realizada por estos autores, basada en la presencia clínica de la enfermedad.

EFICACIA DE LA VACUNACION.

Los problemas de aparición de nodulaciones, pero sobre todo los de retraso en el crecimiento de los animales de reposición sometidos a vacunación han sido descritos por diversos autores (Tejedor, 1987; Adúriz y col. 1989; López, 1989). Ello origina que el ganadero prescinda de la práctica de la vacunación a no ser que la paratuberculosis sea un serio problema en el rebaño. Por lo tanto en nuestro estudio sólo se pudo aplicar el programa higiénico-sanitario y de vacunación sobre dos rebaños previamente muy afectados por la enfermedad clínica.

Los resultados obtenidos en cuanto al descenso de la incidencia clínica anual de un 8% hasta un 1,5% durante el tercer año (segundo potvacunación) en el rebaño "Chatún", de aptitud láctea, y de un 8% hasta un 3% en el rebaño "Fuentepelayo I", de aptitud cárnica, se deben considerar con cautela. Ya que además de la administración de vacuna, se emplearon diversas medidas higiénicas en cuanto a manejo, alimentación y sanidad de las instalaciones. Así pues hay que tener en cuenta que los datos obtenidos suponen el resultado de la suma de todas ellas. En cualquier caso se constató la posibilidad de controlar la enfermedad reduciéndola a límites asumibles económicamente.

De hecho los mejores resultados obtenidos en el rebaño "Chatún", de raza churra y aptitud láctea, se podrían atribuir a un mejor manejo, y a un mayor control de las condiciones del mismo. Algunos ejemplos radicarían en la instauración de lactación artificial, la mejora de aportes nutricionales, la administración permanente de correctores vitaminico-minerales, etc. Este tipo de medidas no pudieron emplearse en un rebaño de raza castellana, régimen semiextensivo, y aptitud mixta carne-leche como el de "Fuentepelayo I", ya que lo habrían hecho económicamente inviable.

El seguimiento del programa en el rebaño "Chatún" durante un cuarto año no ofreció disminución significativa

en cuanto al número de bajas respecto al año anterior (1,5%). Ello contrasta con las observaciones de Wilesmith (1982) quien empleando vacuna viva en bovino en Gran Bretaña obtuvo la desaparición de los casos clínicos al cabo de cuatro años. Este autor sugiere que si simultaneamente se aplican medidas de tipo higiénico esta desaparición de casos clínicos se produciría con mayor rapidez.

Como hechos a destacar durante esta fase del estudio se encuentran la presentación de dos bajas por paratuberculosis clínica (1,68%) entre los animales vacunados en el rebaño "Chatún", así como la de una cordera vacunada que padeció enterotoxemia en el rebaño "Fuentepelayo I". Esta última presentó lesiones granulomatosas en la mucosa intestinal, aislándose el bacilo de Johne de la misma. Así mismo se realizó el aislamiento de esta micobacteria a partir de heces en otro animal vacunado del mismo rebaño. Hechos similares han sido observados por Fuentes y col. (1988), quien aisló M. paratuberculosis del 2,14% de los animales vacunados. En la especie bovina también ha sido descrito (Larsen et al. 1978; Jorgensen, 1983) que los animales vacunados excretan esta micobacteria a través de las heces, aunque en menor medida que los no vacunados. Sherman y col. (1989) en un estudio realizado sobre 48 terneras vacunadas encontraron 3 positivos mediante inmunodifusión y otro animal resultó positivo (2,08%) utilizando el aislamiento a partir de heces. Todos estos resultados están de acuerdo con lo observado por nosotros.

Finalmente, en cuanto a la eficacia de la vacunación y con respecto a los resultados obtenidos podemos deducir que la vacuna protegería frente a la enfermedad clínica pero no evitaría la infección por M. paratuberculosis. Así los animales infectados podrían convertirse en portadores asintomáticos, principales responsables de la diseminación de la enfermedad entre los efectivos del rebaño. Si bien los autores antes citados (Larsen, Jorgensen, Sherman) opinan que en menor medida que los no vacunados.

En segundo lugar, la vacuna viva utilizada podría haber provocado una pequeña migración de gérmenes (vía hemática o linfática) desde el nódulo generado en el punto de inoculación, hacia el órgano diana. Como consecuencia la cepa vacunal se multiplicaría en la mucosa intestinal eliminándose al exterior con las heces.

Por último resulta evidente que la aplicación de la vacuna viva atenuada en estos rebaños junto al uso de medidas higiénicas logró un descenso paulatino y constante de la incidencia clínica de la enfermedad o de los niveles de mortalidad hasta límites económicamente aceptables. Sin embargo, otros autores obtuvieron resultados semejantes en experiencias de este tipo empleando vacuna inactivada (Merkal y col. 1984; Sigurdson, 1960). Este último tipo de vacuna tiene la ventaja de evitar el posible riesgo de diseminación de la cepa vacunal presuntamente atenuada. En este sentido convendría recordar las conclusiones de la III Reunión sobre Paratuberculosis en España (Derio, 1989) en las que los expertos recomendaron el empleo en nuestro país de vacuna inactivada, especialmente en caprino.

VI. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- 1.- Se detectó la presencia de M.paratuberculosis en el 100% de los rebaños estudiados en la provincia de Segovia.
- 2.- La incidencia clínica de la enfermedad resultó del 2.62% en los rebaños de manejo semiextensivo y razas de producción cárnica, y del 5.33% en los de manejo semiintensivo y razas de producción láctea. Su media fue del 4.06%.
- 3.- La prevalencia de paratuberculosis obtenida en los mataderos de la zona analizada representó el 18.27% de los individuos adultos sanos sacrificados.
- 4.- Probablemente las diferencias en cuanto a incidencia clínica de la enfermedad en ambos grupos de población se deberían atribuir más a factores inmunológicos y nutricionales que a la presencia del agente causal en la población, dado que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la prevalencia obtenida.
- 5.- El programa higiénico-sanitario y de vacunación aplicado a dos rebaños de distinta producción y con elevada incidencia inicial (8%), logró disminuirla hasta el 1.5% en el de aptitud láctea, y hasta el 3% en el de aptitud cárnica. El seguimiento se llevó a cabo durante un período de dos años.
- 6.- La vacunación no consiguió la erradicación de los casos clínicos de enfermedad. Por otro lado, se aisló M. paratuberculosis a partir de animales vacunados asintomáticos, así mismo en el rebaño de aptitud láctea se produjeron un 1.68% de bajas por la enfermedad clínica entre los animales vacunados.

- 7.- Por último, en cuanto a los métodos de diagnóstico serológico utilizados, la inmunodifusión ofrecería una especificidad del 100%, detectándose un porcentaje de afectados sanos semejante al de la incidencia clínica anual. Esta técnica resultaría útil para llevar a cabo programas de control y eliminación de positivos. El enzimoimmunoensayo detectó un mayor número de animales infectados que la inmunodifusión, aunque su menor especificidad y baja repetibilidad aconsejan su perfeccionamiento.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, B.; RIEMANN, H.; BEHYMER, O.E.. (1983a). Evaluation of the fluorescent antibody test for diagnosis of Paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** **44** (4): 720-721.

ABBAS, B.; RIEMANN, H.; LONNERDAL, B.. (1983). Isolation of specific peptides from Mycobacterium paratuberculosis protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. **Am. J. Vet. Res.** **44** (12): 2229-2236.

ADURIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; CUERVO, L.; SAEZ DE OCARIZ, C.. (1989). La vacunación en el control de la PTBC ovina: IDR comparativa. Resultados previos. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio, Guipuzcoa. pp: 51-53.

ALLEN, W.M.; BERRET, S.; PATTERSON, D.S.P.. (1974). A biochemical study of experimental Johne's disease. I. Plasma leakage into the intestine of sheep. **J. Comp. Path.** **84**: 381-384

ALLER, B.; FERNANDEZ-DIEZ, M.; ESCUDERO-DIEZ, A.. (1973). Paratuberculosis ovina. **Suplemento científico, Boletín Informativo Consejo General de Colegios Veterinarios de España**. 196: 11-18.

BADIOLA, J.J.; GARCIA DEL JALON, J.A.; CUERVO MENENDEZ, L.. (1986). Paratuberculosis Ovina. **Anales de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, XIV-XV**: 299-308.

BADIOLA, J.J.; JUSTE, R.A.; BALAGUER, L.. (1988). Nuevos resultados de una encuesta sobre Paratuberculosis ovina en Aragón. **I Symposium de Patología Ovina y Caprina**. Zaragoza. p. 34.

BALAGUER AGUT, L.; PERIS PALAU, B.; GARCIA MARIN, J.F.. (1987). Paratuberculosis. Epizootiología. **Bovis n° 18**: 13-20.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M.; ARUNDEL, J.H. & GAY, C.C.. (1989). **Veterinary Medicine**. Baillière Tindall, 7th ed.. London.

BRENNAN, P.J.; HEILETS, M.; ULLUM, B.P.. (1983). Thin-Layer chromatography of lipids antigens as a means of identifying nontuberculous mycobacteria. **J. Clin. Microbiol. 15**: 447-455.

BROOKS, B.W.; ROBERTSON, H.R.; CORNER, A.H.; SAMAGH, B.S.; GARCIA, M.M.; TURCOTTE, C.; DUNCAN, J.R.. (1988). Evaluation of the serological response of sheep in one flock to *Mycobacterium paratuberculosis* by crossed immunoelectrophoresis. **Can. J. Vet. Res. 52**: 199-204

BRUGUERE-PICOUX, J.. (1987). Le diagnostic de la Paratuberculose chez les ruminants. **Rec. Med. Vet. 163**: 539-546.

BUERGELT, C.D.; DE LISLE, G.; HALL, CH.E.; MERKAL, R.S.; DUNCAN, J.R.. (1978). In vitro lymphocyte transformation as herd survey method for bovine paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res. 39**: 591-595.

CAMPHAUSEN, R.T.; JONES, R.L.; BRENNAN, P.J.. (1988). Antigenic relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Am. J. Vet. Res. 49** (8): 1307-1310.

CARRIGAN, M.J.; SEAMAN, J.T.. (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. **Aust. Vet. J.** **67** (2): 47-50.

CARRASCO DE LA PEÑA, J.L.. (1986). El método estadístico en la investigación médica. **3ª Ed. Editorial Ciencia 3, S.A.** Madrid.

CARTER, G.R.. (1984). Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. **4ª ed.. Charles C. Thomas. Publisher. Springfield. Illinois. USA.**

CASAL ROMAN, M. (1990). Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (tuberculosis, lepra y micobacteriosis). **Bio-sell s.a.**

COLLINS, M.T.; MORGAN, J.R.. (1991). Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **119** (12): 1724-1729.

COLLINS, M.T.; MORGAN, J.R.. (1991). Epidemiological model of paratuberculosis in dairy cattle. **Prev. Vet. Med.** **11** (2): 125-130.

COMPAIRE FERNANDEZ, C.; FERNANDEZ CANCIO, A.; SAINZ MORENO, L.. (1986). De la epidemiología clásica a la modelización sanitaria (algunas ideas y ejemplos básicos). **Monografías I.N.I.A. nº 56.** MAPA.

CUERVO MENENDEZ, L.; GONZALEZ ANGULO, L.. (1987). Paratuberculosis: Patogénesis. Cuadro lesional y clínico. **Bovis nº 18:** 23-40.

CUERVO MENENDEZ, L.. (1990). Paratuberculosis ovina. Características clínicas y lesionales. **Ovis nº 7:** 39-47.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S.. (1984). Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. **Cornell Vet.** **74**: 218-262.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.. (1986). The prevalence of Paratuberculosis in culled New England cattle. **Cornell Vet.** **76**: 91-104.

CHIODINI, R.J.. (1986b). Biochemical characteristics of various strains of Mycobacterium paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** **47** (7): 1442-1445.

DAMATO, J.J.; KNISLEY, C.; COLLINS, M.T.. (1987). Characterization of Mycobacterium paratuberculosis by gas-liquid and Thin-Layer Chromatography and rapid demonstration of micobactin dependence using radiometric methods. **J. Clin. Microbiol.** **25** (12): 2380-2383.

DELANNE, J.; FERRANDO, R.; GERVY, R.. (1966). Enterite paratuberculeuse et fumure phosphatee. **Rec. Med. Vet.** **CXLII**: 285-291.

DESMECHT, M.. (1977). Rendement comparé des diverses methodes de diagnostic de la paratuberculeuse. **Ann. Med. Vet.** **121**: 421-423.

DRAKE, T.A.; HINDLER, J.A.; BERLIN, G.W.; BRUCKNER, D.A.. (1987). Rapid identification of Mycobacterium avium complex in culture using D.N.A. probes. **J. Clin. Microbiol.** **25** (8): 1442-1445.

ELLNER, P.D.; KIEHN, T.E.; CAMMARATA, R.; HOSMER, M.. (1988). Rapid detection and identification of pathogenic Mycobacteria by combination radiometric and nucleic acid probe methods. **J. Clin. Microbiol.** **26** (7): 1349-1352.

ELSKEN, L.A.; NONNECKE, B.J.. (1986). In vitro transformation of limphocytes from blood and milk of cows with subclinical paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** **47** (7): 1513-1516.

FOUQUET, G.; DELAUNEY, G.. (1960). Phosphore et enterite paratuberculeuse. **Rec. Med. Vet.** **CXXXVII**. Ed. Vigot Frères.

FUENTES PEREZ, O.. (1988a). Aislamiento de M. paratuberculosis a partir de heces y mucosa intestinal de ovejas y cabras vacunadas contra la Paratuberculosis. **I Simposium de Patología Ovina y Caprina**. Zaragoza. p. 33.

FUENTES, O.; CEBRIAN, J.. (1988b). El conejo de monte, ¿reservorio de la Paratuberculosis ovina y caprina?. **I Simposium de Patología Ovina y Caprina**. Zaragoza. p. 32.

FUENTES PEREZ, O.. (1988c). Aportación al diagnóstico y tratamiento de la Paratuberculosis (enfermedad de Johnne) ovina y caprina. **Tesis doctoral**. U.C.M..

FUENTES PEREZ, O.. (1990). Control y tratamiento de la Paratuberculosis ovina y caprina. **XV Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Córdoba. pp. 127-134.

GARCIA BELENGUER, S.; JUSTE, R.A.; GARCIA MARIN, J.F.; SAEZ DE OCARIZ, C.; BADIOLA, J.J.. (1989). Resultados de algunas pruebas serológicas en rebaños ovinos afectados de Paratuberculosis. **Medicina Veterinaria**. **6** (2): 81-86.

GARCIA MARIN, J.F.; JUSTE, R.A.; PERIS, B.; MARCO, J.C.; SAEZ DE OCARIZ, C.; BADIOLA, J.J.. (1989). Study of the initial phases of the experimental infection with M. paratuberculosis in vaccinated and non vaccinated sheep. **Proc. II Int. Coll. PTBC**. pp. 354-360. Paris. France.

GARCIA MARIN, J.F.. (1990). Paratuberculosis ovina. Patogénesis. **Ovis** nº 7: 25-36.

GARRIDO, F.; LEON, L.. (1979). Diagnóstico de la paratuberculosis caprina en Andalucía. **VII Congreso Nacional de Microbiología**. Cádiz. p. 321.

GARRIDO ABELLAN, F.. (1987). Estado actual de la Paratuberculosis en ovino y caprino. **XII Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Guadalajara. pp. 15-32.

GASCA, A.; FERNANDEZ, F.; IGLESIAS, C.. (1984). Resultados de una encuesta serológica sobre paratuberculosis caprina en Andalucía occidental (Sevilla y Cádiz). **IX Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Granada. pp. 417-420.

GASCA ARROYO, A.. (1989). La Paratuberculosis en los pequeños rumiantes. **XIV Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Jaén. pp. 61-69.

GIESSEN, J.W.B.; HARING, R.M.; VANCLARE, E.; EGER, A.; HAAGSMA, J.; ZEIJST, B.A.M.. (1992). Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *M. paratuberculosis* in cattle. Application in a control program. **J. Clin. Microbiol.** 30 (5): 1216-1219.

GILMOUR, N.J.L.; HALHEAD, W.A. & BROTHERSTON, J.G.; (1965). Studies of immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. **J. Comp. Pathol.** 75: 165-173.

GILMOUR, N. & ANGUS, K. (1983). Johne's disease. **Diseases of sheep**. Martin W.B. ed.. Oxford, Blackwell Sci.

GILMOUR, N.J.L. & ANGUS, K.W.. (1988). Paratuberculosis. **Enfermedades de la oveja**. Martin, W.B. ed. Blackwell Sci., ed. española Acribia. Zaragoza. pp. 57-61.

GILMOUR, N. & NYANGE, J.. (1989). Paratuberculosis (Johne's disease) in deer. **In Practice** **11** (5): 193-196.

GOODFELLOW, M. & MINNIKIN, D.E.. (1984). Circumscription of the genus. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.E. & Wayne, L. G. Eds.. Microbiology series. Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 1-24.

GUIJARRO LACASA, E.; PEDRUELO, F..(1989). Paratuberculosis en la comunidad de Castilla y León. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 42-43.

GUNNARSON, E.; FODSTAD, F.H.. (1979). Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. **Acta Vet. Scand.** **20**: 122-134.

HAWKINS, J.E. (1984). Drug susceptibility testing. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.E. & Wayne, L. G. Eds.. Microbiology series. Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 177-196.

HINES, S.A.; BUERGELT, C.D.; WILSON, J.H.; BLISS, E.L.. (1987). Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **190** (6): 681-683.

HURLEY, S.S.; SPLITTER, G.A.; WELEH, R.A.. (1988). Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family Mycobacteriaceae. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **38** (2): 143-146.

JORGENSEN, J.B. (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. **Nord. Vet. Med.** **29**: 267-270.

JORGENSEN, J.B.. (1982). An improved medium for culture of Mycobacterium paratuberculosis from bovine faeces. **Acta Vet. Scand.** 23: 325-335.

JORGENSEN, J.B.. (1983). The effect of vaccination on the excretion of Mycobacterium paratuberculosis. **Proc. Int. Coll. Res. Paratuberculosis.** 249-254. R.S. Merkal. NADC. Ames, Iowa.

JORGENSEN, J.B.. (1987). Diagnóstico de la Paratuberculosis por métodos microbiológicos e inmunológicos. **II Reunión sobre Paratuberculosis en España.** Derio.

JUSTE JORDAN, R.A.. (1984). Paratuberculosis: Una revisión. **Medicina Veterinaria.** 1 (4): 197-216.

JUSTE JORDAN, R.A.; GARCIA-BELENQUER LAITA, S.. (1987). Diagnóstico de la Paratuberculosis. **Bovis nº 18:** 63-76.

JUSTE JORDAN, R.A.; GELABERT PUJOL, J.L.; SAEZ DE OCARIZ DIAZ DE OTAZU, C.. (1987). Aspectos epizootiológicos de algunas enfermedades del ganado ovino latxo en la C.A.V.:I Metodología y enfermedades crónicas (Maedi, Paratuberculosis). **II Jornadas sobre Producción Animal.** Zaragoza. pp. 230-231.

JUSTE, R.A.; SAEZ DE OCARIZ, C.; ADURIZ, J.J.; MARCO, J.C.; CUERVO, L.. (1989a). Investigación serológica de la Paratuberculosis ovina: técnicas y resultados. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España.** Derio. pp: 17-20.

JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SAEZ DE OCARIZ, C.; ADURIZ, J.J.. (1989b). Estudio comparativo de varios medios para el aislamiento de M. paratuberculosis según la especie animal. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España.** Derio. pp. 36-41.

JUSTE, R.A.; SAEZ DE OCARIZ, C.; BELTRAN DE HEREDIA, F.; AGUD, J.; PORTU, J.; ALDAMIZ-ETXEBARRIA, M.; ZUBIETA, A.. (1989c). La Paratuberculosis: ¿Una zoonosis profesional?. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 60-63.

JUSTE JORDAN, R.A.; ADURIZ RECALDE, J.J.. (1990a). Paratuberculosis ovina. Diagnóstico. **Ovis nº 7** pp: 49-62.

JUSTE JORDAN, R.A.; ADURIZ RECALDE, J.J.. (1990b). Paratuberculosis ovina. Aspectos epidemiológicos. **Ovis nº 7**. pp: 65-75.

JUSTE JORDAN, R.A.; SAEZ DE OCARIZ, C.. (1990c). Paratuberculosis ovina. Control. **Ovis nº 7**. pp: 77-85.

JUSTE JORDAN, R.A.. (1990d). Estudio experimental de las fases iniciales de la Paratuberculosis Ovin. **Tesis. Universidad de Zaragoza**.

KIM, Y.G.; BECH-NIELSEN, S.; GORDON, J.C.; SLEMONS, R.D.; SPANGLER, E.. (1988). Fecal culture of Mycobacterium paratuberculosis in cattle using a centrifugation specimen processing step. **Acta Vet. Scand. sup. 84**: 203-205.

KIMBERLING, C.V. Ed.. (1988). **Jensen and Swift's diseases of sheep**. Lea & Febiger, 3th ed.. pp. 235-238.

KOH, SH.; DOBSON, K.J.; TOMASOVIC, A.. (1988). A Johnes disease survey and comparison of diagnostic test. **Austr. Vet. J. 65** (5): 160-161.

KOPECKY, K.E.. (1973). Distribution of bovine Paratuberculosis in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc. 162** (9): 787-788.

KOPECKY, K.E.. (1977). Distribution of Paratuberculosis in Wisconsin, by soil regions. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **170** (3): 320-334.

LAGADIE, M.; LE MENEC, M.; ARGENTE, G.. (1983). Techniques de cultures de Mycobacterium paratuberculosis: Leur utilisation en routine dans un laboratoire de diagnostic. **Rec. Med. Vet.** **159** (10): 801-807.

LARSEN, A.B.; MILLER, J.M.. (1978). Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines; A controlled field study. **Am. J. Vet. Res.** **39**: 65-69.

LENGHAUS, C.; BADMAN, R.T., GUILLICK, J.C.. (1977). Johne's disease in goats. **Aust. Vet. J.** **53** (9): 460.

LEON VIZCAINO, L.; GARRIDO ABELLAN, F.; PARDO MONTOSA, A.; HEEMOSO DE MENDOZA SALCEDO, M.; CARRANZA GUZMAN, J.. (1984). Observaciones sobre la Paratuberculosis caprina en la España meridional. **Archivos de Zootecnia.** **33** (127): 205-217.

LEPPER, A.W.P.; EMBURY, D.H.; ANDERSON, D.A.; LEWIS, V.M.. (1989). Effects of altered dietary iron intake in Mycobacterium paratuberculosis infected dairy cattle: Secuential observations on growth, iron and copper metabolism and development of Paratuberculosis. **Res. Vet. Sci.** **46**: 289-296.

LEVI, M.L. (1950). The susceptibility of voles to Mycobacterium johnei. **J. Comp. Path.** **66**: 10-16.

LEVY-FREBAULT, V.V.; THOREL, M.F.; VARNEROT, A.; GICQUEL, B.. (1989). DNA Polimorphism in Mycobacterium paratuberculosis, "Wood Pigeon Mycobacteria" and related Mycobacteria analyced by field inversion gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** **27**. (12): 2823-2826.

LILIENTFELD, A.M.; LILIENTFELD, D.E.. (1987). Fundamentos de Epidemiología. **Addison-Wesley Iberoamericana**. Mexico.

LOPEZ ESCAR, A.. (1989). Aspectos en el campo sobre la Paratuberculosis y su vacunación. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp: 54-59.

MANRIQUE DEL CAMPO, A. (1988). Comunicación personal.

MARCO MELERO, J.C.. (1987). Aspectos microbiológicos y cultivo de *Mycobacterium paratuberculosis*. **Bovis** n° 18: 43-60.

MARCO MELERO, J.C.; ADURIZ RECALDE, J.J.. (1990). Paratuberculosis ovina: Sobre *M. paratuberculosis*. **Ovis** n° 7: 9-23.

MCCULLOUGH, W.G.; MERKAL, R.S.. (1982). Structure of mycobactin J. **Curr. Microbiol.** 7: 337-341.

McKEE, T.J.; McCOY, C.P.. (1988). How to diagnose Johne's disease. **Vet. Med. B**, 83 (3): 300-306.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; MARTIN, S.W.; VAN DREUMEL, A.A.. (1991a). An epidemiological study of Paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: Study design and prevalence estimates. **Can. J. Vet. Res.** 55: 246-251.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; BROOKS, B.W.; VAN DREUMEL, A.A.; MARTIN, S.W.; NIELSEN, K.H.; SUGDEN E.A.; TURCOTTE, C.. (1991b). An evaluation of selected screening test for bovine paratuberculosis. **Can. J. Vet. Res.** 55: 252-259.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R.. (1991c). Associations between dairy production indices and Lipoarabinomannan Enzyme-Immunoassay results for Paratuberculosis. **Can. J. Vet. Res.** **55**: 356-361.

McQUEEN, D.S.; RUSSELL, E.G.. (1979). Culture of Mycobacterium paratuberculosis from bovine foetuses. **Aust. Vet. J.** **55** (4): 203-204.

MENDEZ, A.; MOLINA, A.; CARRASCO, L.; CRESPO, M.C.; BAUTISTA, M.J.; SIERRA, M.A.. (1991). Aspectos prácticos del diagnóstico de la paratuberculosis caprina. **XVI Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Pamplona. pp. 351-356.

MERKAL, R.S.; THURSTON, J.R.. (1966). Comparison of Mycobacterium paratuberculosis and other Mycobacteria using standard cytochemical test. **Am. J. Vet. Res.** **27** (117): 519-521.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; KOPECKY, K.E., KLUGE, J.P.; MONLUX, W.S.; LEHMANN, R.P.; QUINN, L.V.. (1968). Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal or intravenous inoculation: Serologic and intradermal test. **Am. J. Vet. Res.** **29** (5): 963-969.

MERKAL, R.S.. (1973). Laboratory diagnosis of bovine Paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **163** (9): 1100-1102.

MERKAL, R.S.; CURRAN, B.J.. (1974). Growth and metabolic characteristics of Mycobacterium paratuberculosis. **Appl. Microbiol.** **28**: 276-279.

MERKAL, R.S.; McCULLOUGH, W.G.; TAKAYAMA, K.. (1981). Mycobactins. The state of the art. **Bull. Inst. Pasteur.** **79**: 251-259.

MERKAL, R.S.; McCULLOUGH, W.G.. (1982). A new mycobactin, Mycobactin J from Mycobacterium paratuberculosis. **Curr. Microbiol.** 7: 333-335.

MERKAL, R.S.. (1984a). Paratuberculosis. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.P. & Wayne, L. Eds.. Microbiology series, Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 1237-1249.

MERKAL, R.S.. (1984). Paratuberculosis: advances in cultural, serologic and vaccination methods. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 184 (8): 939-943.

MERKAL, R.S.; WHIPPLE, D.L.; SACKS, J.M.; SNYDER, G.R.. (1987). Prevalence of Mycobacterium paratuberculosis in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 190 (6): 676-680.

MERKAL, R.S.. (1989).. Diagnóstico de la Paratuberculosis ovina y caprina. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 11-15.

MILNER, A.R.; LEPPER, A.W.D.; GRUNER, E.; SYMONDS, W.N.. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis after absorption of serum with M. phlei. **Res. Vet. Sci.** 42: 140-144.

MILNER, A.R.; MACK, W.N.; COATES, K.J.. (1989). A modified ELISA for the detection of goats infected with Mycobacterium paratuberculosis. **Aust. Vet. J.** 66 (9): 305-307.

MOLINA, A.; CRESPO, M.; MORERA, L.; LLANES, D.. (1989). Una técnica para el diagnóstico de la Paratuberculosis en cabras: Parámetros del test. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 21-28.

MOLINA ALCALA, A.; CRESPO GIRALDEZ, M.C.; FRESNO BAQUERO, M.; DELGADO BERMEJO, J.V.; MORERA SANZ, L.; LLANES RUIZ, D.. (1990a). Estudios preliminares de resistencia genética a la paratuberculosis. **XV Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Córdoba. pp. 40-43.

MOLINA ALCALA, O.; CRESPO GIRALDEZ, M.C.; LOPEZ ESCAR, A.; MORENA SANZ, L.; LLANES RUIZ, D.. (1990b). Paratuberculosis caprina: Estrategias del diagnóstico según la incidencia de la enfermedad. **XV Jornadas Científicas de la S.E.O.C..** Córdoba. pp. 135-138.

MOMOTANI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F.. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. **Vet. Pathol.** 25: 131-137.

MOYLE, A.I.. (1975). Culture and cull procedure for control of Paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 166 (7): 689-690.

MUHAMMED, S.I.; ELIASSON, E.C.. (1979). The prevalence of antibodies to Mycobacterium johnei in calostrum derived lambs. **Vet. Rec.** 105: 11-12.

NAVARRO, J.A.; BERNABE, A.; GOMEZ, M.A.; SANCHEZ, J.; GOMEZ, S.. (1989). Aplicación de la técnica inmunocitoquímica PAP como método alternativo en el diagnóstico histológico de la Paratuberculosis. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España.** Derio. pp. 29-34.

NAVARRO, J.A.; BERNABE, A.; GOMEZ, M.A.; SANCHEZ, J.; GOMEZ, S.. (1991). Mycobacterial antigen detection by Immunohistochemistry in goat Paratuberculosis. **J. Vet. Med.** 38: 231-237.

ORDAS ALVAREZ, J.; REY GUERRERO, M.A.; GONZALEZ HORTAL, L.. (1989). Lucha contra la Paratuberculosis. Problemática del diagnóstico serológico. **III Reunión sobre la Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 44-50.

PEPIN, M.; MARLY, L.; PARDON, P.. (1987). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and the complement fixation test for Paratuberculosis. **Vet. Rec.** 120: 236.

PETIT, J.F. & LEDERER, E.. (1984). The structure of mycobacterial cell wall. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.P. & Wayne, L. Eds.. Microbiology series, Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 301-313.

PEREA, A.; MIRANDA, A.; CARRANZA, J.; ARENAS, A.; MALDONADO, A.; TARRADAS, M.C.. (1990a). Procesos infecciosos en la especie caprina: casuística en el sur de España (1982-1989). **XIV Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Jaén. pp. 385-387.

PEREA, A.; MIRANDA, A.; CARRANZA, J.; ARENAS, A.; MALDONADO, A.; TARRADAS, M.C.. (1990b). Procesos infecciosos en la especie ovina: casuística en el sur de España (1982-1989). **XIV Jornadas Científicas de la S.E.O.C.** Jaén. pp. 389-393.

PEREZ PEREZ, V.; GARCIA MARIN, J.F.; PERIS PALAU, B.; BADIOLA DIEZ, J.J.; JUSTE JORDAN, R.A.. (1989). Detección de *M. paratuberculosis* en secciones de tejido mediante la técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa. Estudio comparativo con la técnica de Ziehl-Neelsen. **III Reunión sobre Paratuberculosis en España**. Derio. pp. 30-34.

RATLEDGE, C.. (1984). Metabolism of iron and metals by mycobacteria. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.P. & Wayne, L. Eds.. Microbiology series, Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 603-628.

RASTOGI, N.; HELLIO, R.. (1990). Evience that the capsule around mycobacteria grown in axenic media contains mycobacterial antigens: implications at the level of cell envelope architecture. **FEMS Microbiol. Letters. 70**: 161-166.

RATNAMOHAN, T.N., SPENCER, T.L.. (1986). A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. **Aust. Vet. J. 63** (6): 185-187.

RICHARDS, W.D.. (1988). The apparent effect of environmental acidity on the incidence of Paratuberculosis. **Proc. II Int. Coll. PTBC. Paris. pp**: 342-349.

RIDGE, S.E.; MORGAN, I.R.; SOCKETT, D.C.; COLLINS, M.T.; CONDRON, R.J.; SKILBECK, N.W.; WEBBER, J.J.. (1991). Comparison of the johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. **Aust. Vet. J. 68** (8): 253-257.

RIEMANN, H.; RAFIGUZ ZAMAN, M.; RUPPANNER, R.; AALUND, O.; JORGENSEN, J.B.; WORSAAE, H.; BEHYMER, D.. (1979). Paratuberculosis in cattle and free living exotic deer. **J. Am. Vet. Med. Assoc. 174** (8): 841-843.

ROGALL, T.; WOLTERS, J.; FLOHR, T.; BOTTGER, E.C.. (1990a). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. **Int. J. Sys. Bacteriol. 40** (4): 323-330.

ROGALL, T.; FLOHR, T.; BOTTGER, E.C.. (1990b). Diferentiation of *Mycobacterium* species by direct secuencing of amplified DNA. **J. Gen. Microbiol. 136**: 1915-1920.

RUSSELL, E.G.; MILNER, A.R.. (1978). Serological similarity between caprine and bovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Aust. Vet. J. 54**: 484-485.

SAEZ DE OCARIZ DIAZ DE OTAZU, C. (1987). Control de la Paratuberculosis bovina. **Bovis n° 18**: 79-90.

SANCHEZ VIZCAINO, J.M.; CAMBRA ALVAREZ, M.. (1981). Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. **Monografías INIA n° 29**. MAPA.

SAXEGAARD, F.; FODSTAD, F.H.; (1985). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. **Vet. Rec. 116**: 439-441.

SAXEGAARD, F.; BAESS, I.. (1988a). Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria". Determinations by DNA-DNA hybridization. **A. P. M. I. S. 96**: 37-42.

SAXEGAARD, F.; BAESS, I.; JANTZEN, E.. (1988b). Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty analysis. **A. P. M. I. S. 96**: 497-502.

SAXEGAARD, F. (1990). Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. **J. Comp. Path. 102**: 149-156.

SCOTT-OVR, H.; EVERETT, R.E.; OTTOWAY, S.J.; NORTH, R.N.. (1988). Estimation of direct and indirect losses due to Johnes disease in New South Wales, Australia. **Acta Vet. Scand. Sup 84**: 411-414

SEAMAN, J.T.; GARDNER, J.A.; DENT, C.H.R.. (1981). Johnes's disease in sheep. **Aust. Vet. J. 57**(2): 102-103.

SEAMAN, J.T.; THOMPSON, D.R.. (1984). Johnes's disease in sheep. **Aust. Vet. J. 61** (7): 227-229.

SEGAL, W.. (1984). Growth dynamics of in vivo and in vitro grown mycobacterial pathogens. **The Mycobacteria, a sourcebook**. Kubica, G.P. & Wayne, L. Eds.. Microbiology series, Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 547-574.

SHERMAN, D.M.; GEZON, H.M.. (1980). Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **177** (12): 1208-1211.

SHERMAN D.M.; MARKHAM, R.J.F.; BATES, F.. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **185** (2): 179-182.

SHERMAN, D.M.; BRAY, B.; GAY, J.M.; BATES, F. (1989). Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. **Am. J. Vet. Res.** **50** (4): 525-530.

SHERMAN, D.M.; GAY, J.M.; BOULEY, D.S.; NELSON, G.H.. (1990). Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** **51** (3): 461-465.

SHULAW, W.P.; GORDON, J.C.; BECH-NIELSEN, S.; PRETZMAN, CH.; HOFFSIS, CH.I.. (1986). Evidence of Paratuberculosis in Ohio's white-tailed deer, as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.** **47** (12): 2539-2542.

SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; RINGS, D.M.; GETZY, D.M.; WOODRUFF, T.S.. (1993). Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. **Am. J. Vet. Res.** **54** (1): 13-19.

SIGURDSON, B.. (1960). A killed vaccine against paratuberculosis (Johne's disease) in sheep. **Am. J. Vet. Res.** **21**: 54-67.

SIMPSON, C.F. (1966). Electron microscopy of arteriosclerosis in cows with Johne's disease. **Am. J. Vet. Res.** **27**: 1197-1204.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G.. Eds. (1986). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Williams & Wilkins. Valtimore. Vol. 2: 1435-1457.

STUART, P. (1965). A pigmented *M. johnei* strain of bovine origin. **Br. Vet. J.** **121**: 332-334

SUGDEN, E.A.; CORNER, A.H.; SAMAGH, B.S.; BROOKS, B.W.; TARVETTE, C.; NIELSEN, K.H.; STEWART, R.B.; DUNCAN, J.R.. (1989). Serodiagnosis of ovine paratuberculosis using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.** **50** (6): 850-854.

SUMMERS, B.A. (1981). Laboratory diagnosis of Johne's disease: A potential source of error. **Vet. Rec.** **108**: 166-167.

TAYLOR, W.A. (1951). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. **J. Path. Bact.** **63**: 333-336. Ref. tomada de JUSTE, R. A., 1984.

TEJEDOR MARTIN, F.J. (1986). Sanidad Ovino; Manejo sanitario del rebaño contra la Paratuberculosis. **Esp. Agr. Gan.** **148**: 41-44.

THAYER, W.R.; COUTU, J.A.; CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, A.J.; MERKAL, R.S.. (1983). Mycobacterial antibodies in patients with Crohn's disease. **Proc. Int. Coll. Res. PTBC**. Ames, Iowa, USA. pp. 265-272.

THOEN, C.O.; MUSCOPLAT, C.C.. (1979). Recent developments in diagnosis of Paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **174** (8): 838-840.

THOEN, C.O.; BAUM, K.H.. (1988). Current knowledge on paratuberculosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **192** (11): 1609-1611.

THOREL, M.F.; VALETTE, L.. (1979). Etude de *Mycobacterium paratuberculosis* d'origine caprine et comparaison avec *M. paratuberculosis* d'origine ovine et bovine. **Rev. Med. Vet.** **130** (12): 1623-1633.

THOREL, M.F.; FEBRAULT, V.L.. (1988). Classification et identification de *Mycobacterium paratuberculosis* et des mycobacteries apparentées. **Proc. II Int. Coll. PTBC**. Paris, France. pp. 283-292.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H; SCOTT, F.W. & BARLOUGH, J.E. Eds.. (1988). **Hagan y Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. Comstock Plub. Ass., Cornell Univ. Press. 8^{ed.}, 280-286.

VAN KRUININGEN, H.J.; RUIZ, B.; GUMPRECHT, L.. (1991). Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease. **Can. J. Vet. Res.** **55**: 199-202.

VARY, P.M.; ANDERSEN, P.R.; GREEN, E.; HERMONTAYLOR, J.; McFADDEN, J.J.. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. **J. Clin. Microbiol.** **28** (5): 933-937.

WAYNE, L.G. (1984). *Mycobacterial speciation. The Mycobacteria, a sourcebook*. Kubica, G.P. & Wayne, L. Eds.. Microbiology series, Marcel Dekker, Inc.. N.Y. pp. 25-65.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P.. (1986). The micobacteria. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2.** . Sncath, P.H.A. & Halt, J.G. ed.. Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1435-1457.

WHIPPLE, D.L.; LE FEBURE, R.B.; ANDREWS JR, R.E.; THIERMANN, A.B.. (1987). Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from Mycobacterium paratuberculosis and other Mycobacterium species. **J. Clin. Microbiol.** 25 (8): 1511-1515.

WHIPPLE, D.L.; KAPKE, P.; VARY, C.. (1990). Identification of restriction fragment length polymorphism in DNA from Mycobacterium paratuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 28 (11): 2561-2564.

WILESMITH, J.W.. (1982). Johne's disease: a restrocpective study of vaccinated herds in Great Britain. **Br. Vet. J.** 138: 321-331.

WILLIAMS, E.S.; DEMARTINI, J.C.; SNYDER, S.P.. (1985). Lymphocyte blastogenesis, complement fixation, and fecal culture as diagnostic test for Paratuberculosis in North American wild ruminants and domestic sheep. **Am. J. Vet. Res.** 46 (11): 2317-2321.

WORTHINGTON, R. (1964). Paratuberculosis. Enfermedades de importancia naciente en los animales. **F.A.O.** Roma.

YOKOMIZO, Y.; MERKAL, R.S.; LYSLE, P.A.S.. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to protoplasmic antigen of Mycobacterium paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** 44 (11): 2205-2207.

YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; MERKAL, R.S.. (1985). A method for avoiding false positive reactions in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine Paratuberculosis. **Jap. J. Vet. S.** **47** (1): 111-119.

YOSHIMURA, H.H.; GRAHAM, D.Y.. (1988). Nucleic acid hybridation studies of mycobactin-dependent Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.** **26** (7): 1309-1312.

ZARZUELO PASTOR, E. (1987). Paratuberculosis (revisión). **ONE Vet.** **66**: 40-54.

ZURBRICK, B.G.; FOLLETT, D.M.; CZUPRYNSKY, CH.J.. (1988). Cytokine regulation of the intracellular growth of Mycobacterium paratuberculosis in bovine monocytes. **Infect. Immun.** **56** (7): 1692-1697.

VIII. ICONOGRAFIA

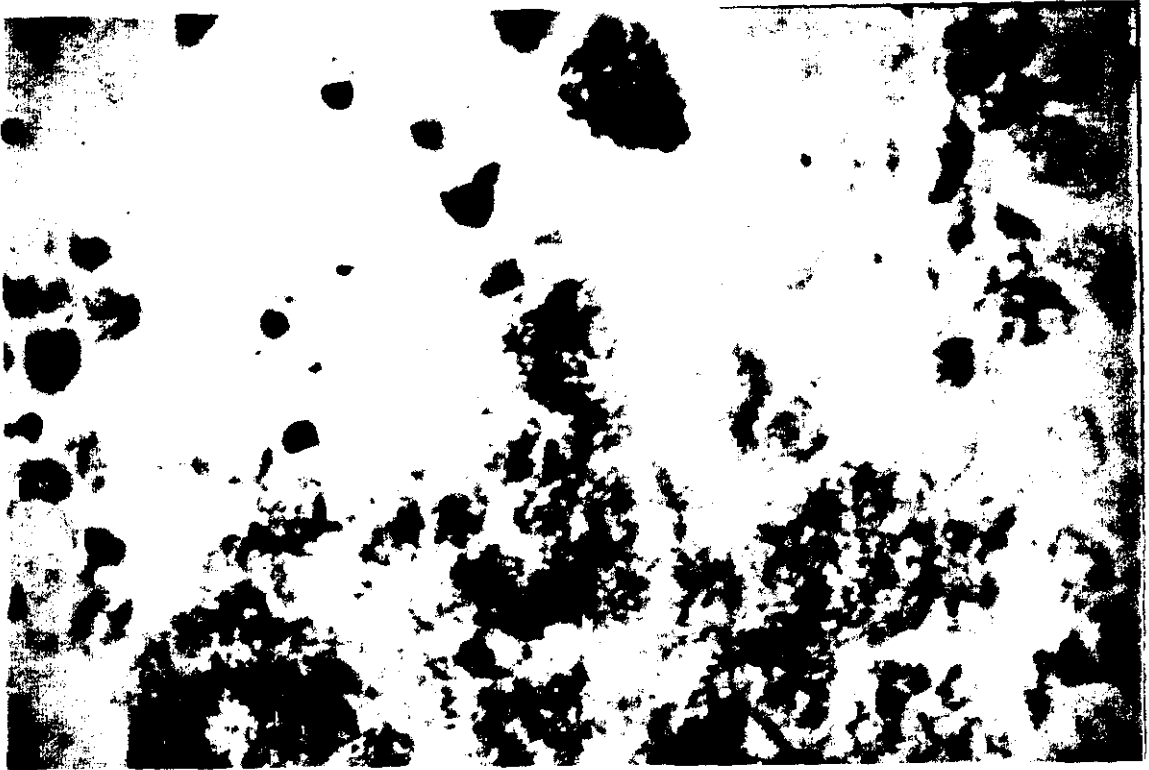


Fig. nº 1.- Frotis de mucosa intestinal con elevado número de M. paratuberculosis. Grado de positividad +++ (Z-N).



Fig. nº 2.- Frotis de mucosa intestinal con moderada cantidad de M. paratuberculosis. Grado de positividad ++ (Z-N).

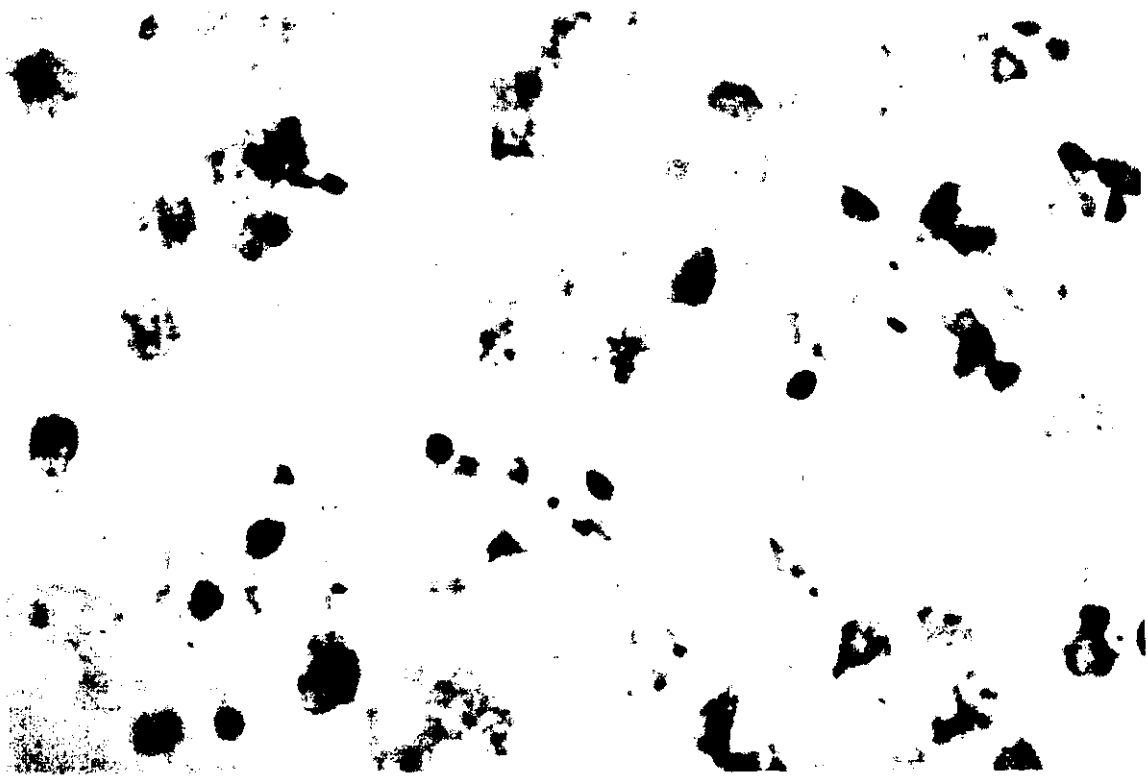


Fig. nº 3.- Frotis de mucosa intestinal que presenta un escaso número de micobacterias. Grado de positividad + (Z-N).

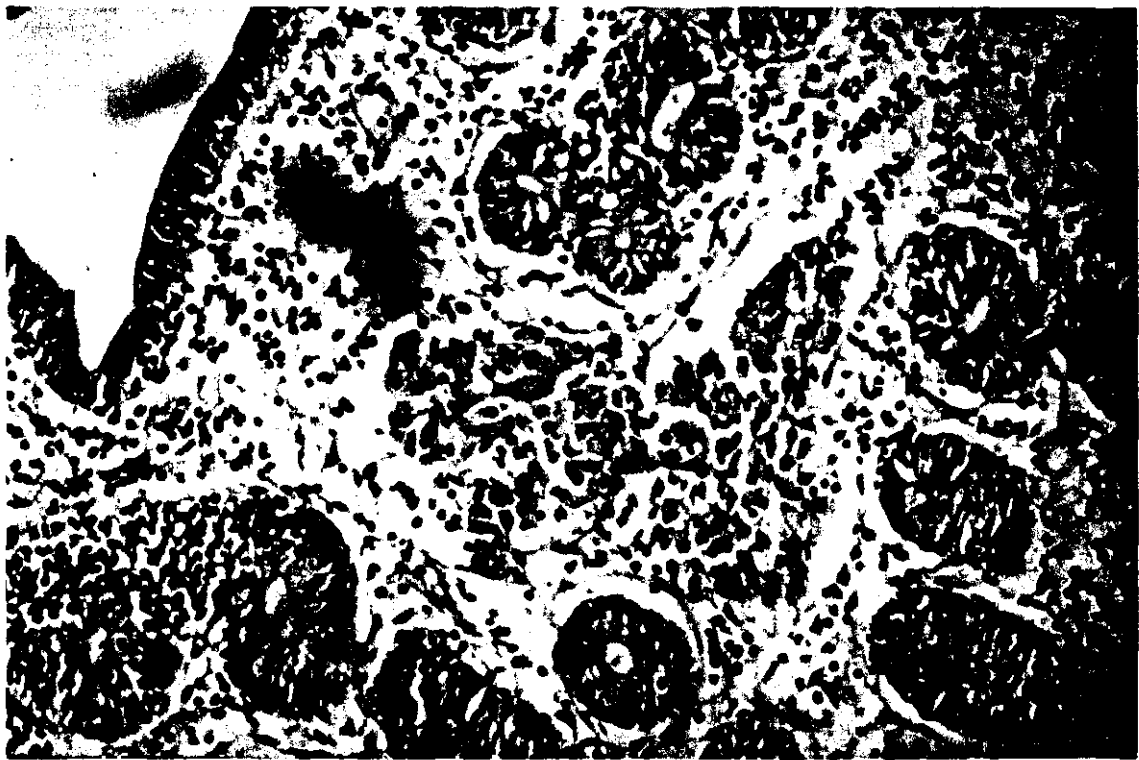


Fig. nº4.- Infiltrado celular focal integrado por células epitelioides, macrófagos y células redondas en la lámina propia de la mucosa de la válvula ileocecal (H-E).

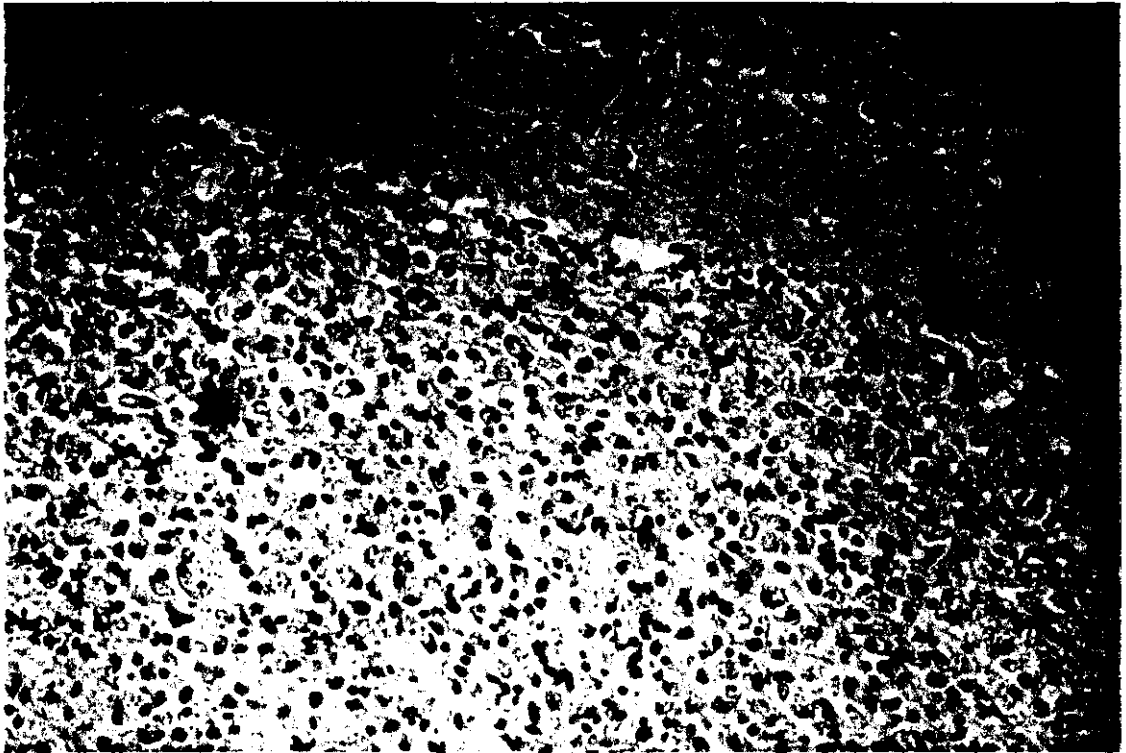


Fig. nº5.- Abundante infiltrado en la submucosa intestinal. Célula predominante de tipo epiteliode (H-E).



Fig. nº6.- Infiltrado inflamatorio de la lámina propia integrado por macrófagos, células epiteliodes, linfocitos y células plasmáticas (H-E).

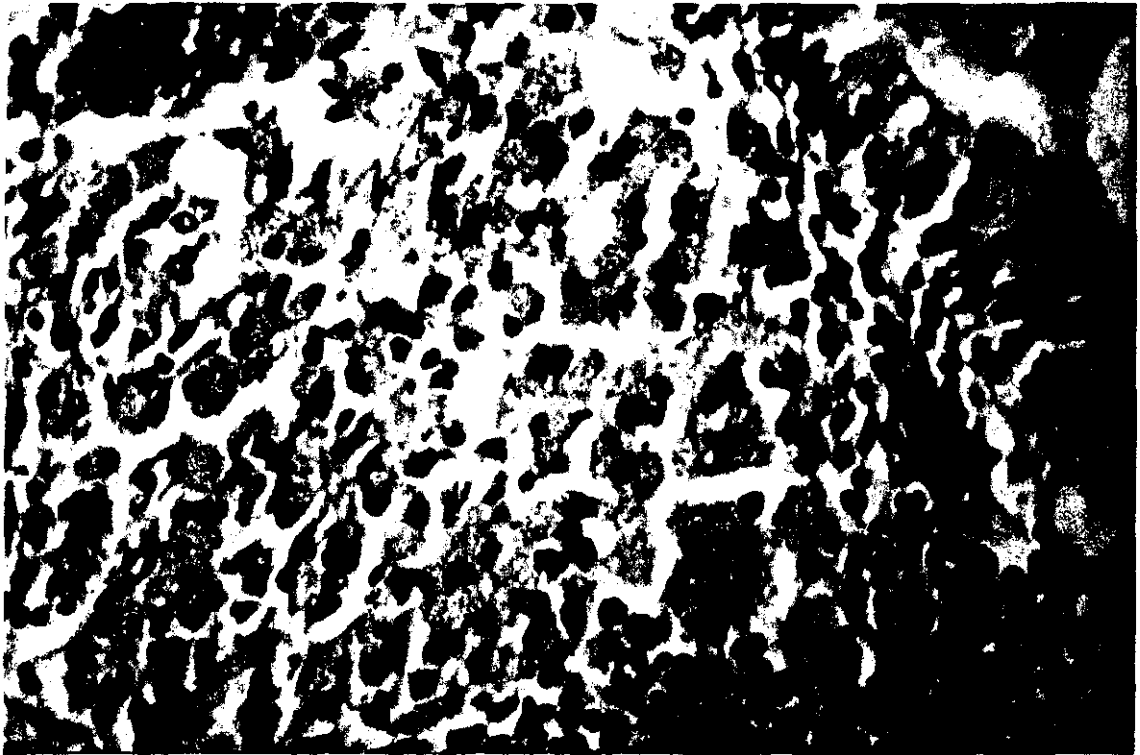


Fig. nº 7.- Infiltrado celular constituido por macrófagos y células epitelioides delimitado por linfocitos (H-E).

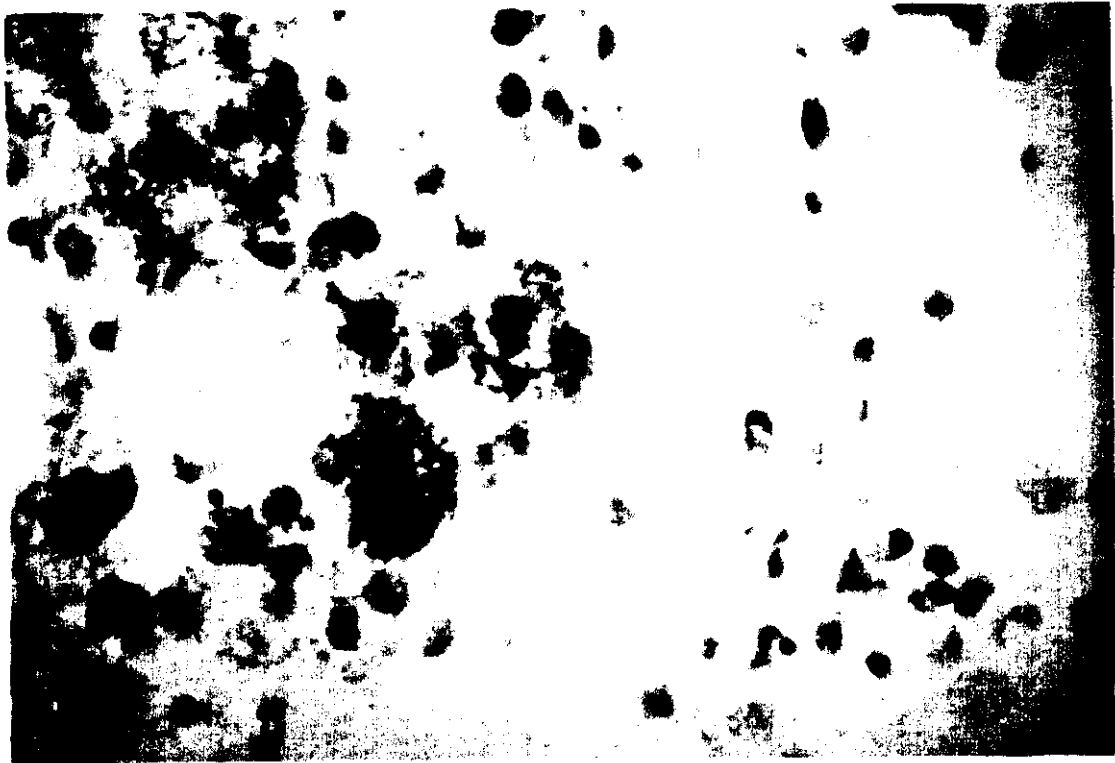


Fig. nº 8.- Abundantes bacterias ácido alcohol-resistentes en el interior de los macrófagos (Z-N).